

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD  
PÚBLICA

ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE MAILLARD EN PAPILLAS  
LISTAS PARA EL CONSUMO

LOURDES BOSCH JUAN

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 5 de Juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. Reyes Barberá Sáez
- D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Dolores del Castillo Bilbao
- D<sup>a</sup>. Belén García-Villanova Ruiz
- D<sup>a</sup>. María Izquierdo Pulido
- D<sup>a</sup>. Teresa Salabert Salvador

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Rosaura Farre Rovira

D<sup>a</sup>. Amparo Asunción Alegría Toran

©Copyright: Servei de Publicacions  
Lourdes Bosch Juan

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6947-0

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

VNIVERSITATĠ DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia



Estudio de la reacción de Maillard  
en papillas listas para el consumo

TESIS DOCTORAL

Lourdes Bosch Juan

Valencia, Febrero 2007

A

B

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Facultat de Farmàcia

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,  
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal  
Àrea de Nutrició i Bromatologia

**ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE MAILLARD  
EN PAPILLAS LISTAS PARA EL CONSUMO**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:  
Lourdes Bosch Juan

Dirigida por:  
Dra. Dña. Amparo Alegría Torán  
Dra. Dña. Rosaura Farré Rovira

Valencia, Febrero 2007

C

D



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**Facultat de Farmàcia**

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,  
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal  
Àrea de Nutrició i Bromatologia

AMPARO ALEGRÍA TORÁN y ROSAURA FARRÉ ROVIRA,  
profesora titular y catedrática, respectivamente, del área de Nutrición y  
Bromatología del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública,  
Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la  
Universitat de València,

CERTIFICAN QUE: la licenciada en Farmacia LOURDES  
BOSCH JUAN ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del  
área de Nutrición y Bromatología, un trabajo que lleva por título:  
**“Estudio de la reacción de Maillard en papillas listas para el  
consumo”**, y autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en  
Farmacia.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado, en  
Valencia, Febrero de 2007.

Fdo: Amparo Alegría Torán

Fdo: Rosaura Farré Rovira

E

F

Este trabajo forma parte del contrato de Investigación entre la Universitat de València y Hero España S.A., para el estudio de la “Estabilidad de las papillas listas para el consumo/leches de crecimiento. Búsqueda de indicadores de rutina para su evaluación y estudio durante el período de vida útil”.

Grupo de investigación *Bionutest* (03/003).

La doctoranda Lourdes Bosch Juan ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia.

H

La realización de esta tesis me ha permitido ampliar mi conocimiento científico y me ha brindado la oportunidad de conocer y redescubrir a personas maravillosas que me han acompañado en el camino. A todas ellas quisiera expresar mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Rosaura Farré, por concederme el privilegio de estar a su lado y poder aprender de toda su sabiduría. Gracias por la orientación, el esfuerzo y el tiempo dedicado.

A la Dra. Amparo Alegría, por ser una excelente directora y amiga, por transmitirme enseñanzas tan valiosas y saber aconsejarme lo mejor en todo momento. Gracias por confiar en mí, por la paciencia y el apoyo.

A las Dras. Reyes Barberá y M<sup>a</sup>Jesús Lagarda, por su cariño y disposición para escucharme y prestarme su ayuda. A las Dras. Ana Frígola, M<sup>a</sup>José Esteve y Victoria Alonso, por interesarse continuamente por mi trabajo y por su afecto.

A la Dra. Isabel Frasquet, porque era una persona admirable y era un regalo poder pasar un ratito escuchándola. Siempre recordaremos todo lo que aprendimos con ella.

A Lupe, Clara, Sara y Ana, por estar siempre ahí a lo largo de estos años de tesis, por las numerosas veces que se han preocupado por mí y especialmente por su amistad. Ha sido un placer trabajar y compartir ideas e inquietudes con vosotras.

A Toni, Ramón, Celia, M<sup>a</sup>José, Francisco, Rebeca, Moisés, Loles, Inma, Blanca, Pili, Vicente, Esther, Fernando, Paco, Mónica y Meli, mis compañeros y amigos del laboratorio y el día a día, tanto los que siguen, como los que ya se fueron, por poder siempre contar con ellos, por crear un ambiente de trabajo agradable y por los buenos ratos pasados.

A los compañeros del área de Toxicología, por su simpatía y por estar siempre dispuestos a colaborar.

A Amparo, Carmen y Juana, por resolver con una sonrisa cualquier problema técnico y administrativo.

A la Dra. Loli del Castillo del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC, por su labor científica, por los continuos ánimos durante mi estancia y por ser una persona tan agradable. A las Dras. Antonia Montilla y M. Luz Sanz, por prestarme su colaboración en todo momento y portarse estupendamente conmigo.

Al Dr. Agustín Olano y las Dras. Nieves Corzo y Mar Villamiel del IFI, por su atención y tan cordial acogida.

A Miryam, Jose, Fernando, Javi, Valle, Alejandra, Marta, Jürgen, Ana, Laura y Adolfo del IFI, por ser unos compañeros excelentes y por hacerme sentir como en casa desde el primer día.

Al Dr. Gonzalo Clemente, por su inestimable ayuda en el tratamiento estadístico de los resultados.

J

A la Dra. Ana Salvador, por las facilidades dadas para poder llevar a cabo la medida del color de las muestras.

A Hero España S.A., por su contribución para la realización de este trabajo.

A mis padres, que siempre me han apoyado y sin los cuales nada habría conseguido. Gracias por ayudarme desde el principio y mostrarme tanto cariño.

A mi hermano y amigo, por tener un carácter tan espontáneo y alegre y llevarnos tan bien.

Muy especialmente a Rodri, al que tengo que agradecer todo y más. Gracias por ser como eres, por tu comprensión, por cuidarme tanto y sobre todo por compartir la vida conmigo.

A todas aquellas personas que no he nombrado y se han preocupado por la evolución de este trabajo.

L

**A mis padres**

**M**

N

**A Rodri**

O

P

## Índice

---

R

---

	<b>Página</b>
<b>Índice de cuadros</b>	I
<b>Índice de figuras</b>	V
<b>Abreviaturas</b>	IX
<b>Objeto del trabajo</b>	3
<b>Plan de trabajo</b>	7
<b>Introducción</b>	
1. Alimentación infantil	11
1.1. Alimentación en la lactancia y en la infancia	11
1.1.1. Alimentación durante los primeros 5 o 6 meses	12
1.1.2. Alimentación desde el 5°-6° mes de vida hasta el año de edad	14
1.1.3. Alimentación a partir del primer año de vida	15
1.2. Tipos de alimentos infantiles comerciales utilizados en la alimentación complementaria o Beikost	16
1.3. Legislación	18
2. Importancia de las proteínas en la alimentación del lactante y niño de corta edad	23
2.1. Requerimientos y recomendaciones de proteínas y aminoácidos	23
2.1.1. Criterios para determinar las necesidades proteicas	26

2.1.2. Criterios para determinar las necesidades de aminoácidos	29
2.2. Evaluación de la calidad proteica	33
2.2.1. Determinación de los índices químicos	36
2.2.2. Determinación de la digestibilidad de las proteínas	38
2.2.3. Determinación de la biodisponibilidad de las proteínas	39
3. Reacción de Maillard	43
3.1. Química de la RM	44
3.2. Factores que afectan al desarrollo de la RM	55
3.2.1. Naturaleza y concentración de los compuestos que reaccionan	55
3.2.2. Actividad de agua y estado físico-químico del alimento	56
3.2.3. pH	56
3.2.4. Temperatura	57
3.2.5. Otros factores	58
3.3. Consecuencias de la RM	58
3.3.1. Efectos sobre el valor nutritivo	59
3.3.2. Aspectos toxicológicos	62
3.3.3. Capacidad antioxidante/prooxidante de los PRM	67
3.4. Indicadores de la RM durante el procesado y almacenamiento de los alimentos	69
3.4.1. Indicadores de las etapas iniciales de la RM	69
3.4.2. Indicadores de las etapas avanzadas de la RM	71

---

3.4.3. Indicadores de las etapas finales de la RM	76
---------------------------------------------------	----

## **Parte experimental**

1. Instrumentación, material y reactivos	81
1.1. Instrumentación	81
1.2. Material	84
1.3. Reactivos	85
2. Muestras	91
2.1. Papillas de cereales con leche (PCL)	91
2.1.1. Descripción y composición	91
2.1.2. Proceso de fabricación	93
2.1.3. Muestreo	96
2.2. Otros alimentos	96
3. Métodos de análisis	99
3.1. Aminoácidos	99
3.1.1. Preparación de la muestra	99
3.1.2. Determinación por CLAR	102
3.1.3. Análisis cualitativo y cuantitativo	104
3.2. Furosina	108
3.2.1. Preparación de la muestra	108
3.2.2. Determinación por CLAR	109
3.2.3. Cálculo del porcentaje de lisina bloqueada	111
3.3. Compuestos fluorescentes (AGEs)	112

3.4. N <sup>ε</sup> -Carboximetil-lisina (CML)	114
3.4.1. Preparación de la muestra	115
3.4.2. Determinación por GC-FID	118
3.4.3. Identificación de lisina, LAL y CML	119
3.4.4. Cuantificación de lisina, LAL y CML	127
3.5. Color	127
3.6. Análisis estadístico	129
4. Resultados y discusión	131
4.1. Optimización y validación de métodos de determinación de compuestos indicadores de la RM	131
4.1.1. Aminoácidos	131
4.1.2. Compuestos fluorescentes	143
4.1.3. CML	144
4.2. Aminoácidos en PCL	148
4.2.1. Contenidos	148
4.2.2. Calidad proteica	151
4.3. Influencia del almacenamiento en la evolución de la RM en PCL	155
4.3.1. Furosina	155
4.3.2. Compuestos fluorescentes (AGEs fluorescentes)	166
4.3.3. Color	180
4.3.4. Relación entre los indicadores de las distintas etapas de la RM	185

---

4.4. CML	188
4.4.1. Optimización del proceso de preparación de sistemas modelo	188
4.4.2. CML en sistemas modelo	188
4.4.3. Formación de CML a partir de compuestos de Amadori	191
4.4.4. CML en muestras de alimentos	192
<b>Conclusiones</b>	201
<b>Bibliografía</b>	207
<b>Difusión de resultados</b>	235



**ÍNDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Composición de aminoácidos de la caseína	22
2	Ingestas dietéticas de referencia de proteínas (g/kg/día) para lactantes y niños de corta edad según FNB (2005)	29
3	Requerimientos estimados de proteínas (g/kg/día) para lactantes y niños de corta edad según FAO/OMS (1985)	29
4	Requerimiento estimado medio (EAR) e ingesta dietética recomendada (RDA) de aminoácidos (mg/kg/día) para lactantes y niños de corta edad según FNB (2005)	34
5	Estimación del requerimiento de aminoácidos (mg/kg/día) para lactantes y niños de corta edad según FAO/OMS (1985)	34
6	Composición de aminoácidos (mg/g proteína) de las proteínas patrón de referencia propuestas por la FAO/OMS (1985) y el FNB (2002) para lactantes y niños de corta edad	37
7	Valor energético (kcal/100g) y composición (g/100g) de las PCL estudiadas	91
8	Vitaminas y minerales que contienen las PCL estudiadas	92
9	Cantidad de proteína presente en los alimentos en los que se realiza la determinación de CML	98
10	Gradiente de elución seleccionado para la determinación cromatográfica de los aminoácidos	103
11	Factores de respuesta (F) obtenidos para los aminoácidos	105

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
12	Precisión del método de determinación de compuestos fluorescentes expresada en % CV	114
13	CML. Cantidad de alimento hidrolizado (equivalente a 22 mg de proteína)	117
14	Fragmentos principales obtenidos en los MS de los N-tert-butildimetilsilil derivados de CML1, CML2, LAL y CHPL	126
15	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) en la determinación de aminoácidos	133
16	Estudio del efecto de la matriz (método de adición) en la determinación de aminoácidos	136
17	Precisión expresada como coeficiente de variación en la determinación de aminoácidos	138
18	Exactitud de la derivatización y/o determinación cromatográfica de los aminoácidos de las PCL	140
19	Exactitud del método de determinación de los aminoácidos estimada con ensayos de recuperación con caseína añadida	142
20	LD, precisión y exactitud (% de recuperación) obtenida por otros autores para la determinación de CML utilizando distintas técnicas	145
21	Contenido de aminoácidos (mg/g proteína), expresado como media $\pm$ desviación estándar, en las tres PCL (A, B y C) analizadas	149
22	Porcentajes de cumplimiento de las RDA para aminoácidos esenciales y semiesenciales proporcionados por una ración (250 mL) de PCL de tipo A, B (con miel) y C (con frutas)	152

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
23	Índice químico y aminoácido limitante considerando como proteína de referencia la caseína (ESPGAN, 1981; Directiva 2006/125/CE) o la proteína patrón propuesta por la FAO/OMS (1985)	153
24	Contenidos de furosina (mg/g proteína) de las PCL analizadas	156
25	Pentodil-lisina libre en las PCL analizadas, expresada como % IF respecto a un patrón de sulfato de quinina de 7.5 µg/mL	167
26	Pentodil-lisina total en las PCL analizadas, expresada como % IF respecto a un patrón de sulfato de quinina de 7.5 µg/mL	168
27	AGEs libres en las PCL analizadas, expresados como % IF respecto a un patrón de sulfato de quinina de 0.5 µg/mL	169
28	AGEs totales en las PCL analizadas, expresados como % IF respecto a un patrón de sulfato de quinina de 0.5 µg/mL	170
29	Valores medios (n=4) de los parámetros de la medida del color L*, a* y b* para las tres PCL analizadas	181
30	Regresión simple y correlaciones parciales entre los indicadores de la reacción de Maillard	186
31	Lisina, CML y LAL, expresada en mg/100 g proteína, en los alimentos analizados	194
32	CML obtenida por distintos autores en distintos alimentos	195
33	LAL obtenida por diferentes autores en distintos alimentos	197



**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Mercado de alimentos infantiles en España (Mercasa, 2006)	19
2	Etapa inicial de la RM en la leche	46
3	Vía 1,2-E de la RM en la leche	49
4	Vía 2,3-E de la RM en la leche	50
5	Degradación de Strecker	53
6	Vías de formación de CML in vitro	75
7	Diagrama de fabricación de las PCL	95
8	Cromatograma obtenido para un patrón de aminoácidos (a) y patrón de MetS y CysA (b) (0.01mM de cada aminoácido)	106
9	Cromatogramas correspondientes a los aminoácidos de una papilla B analizada sin (a) y con (b) oxidación perfórmica previa a la hidrólisis ácida	107
10	Estructura de la furosina y cromatogramas obtenidos en la determinación de furosina en: (a) patrón de concentración 2 µg/mL y (b) papilla A	110
11	Determinación de CML, lisina y LAL por CG-FID. Programa de calentamiento del horno	119
12	Cromatograma obtenido al inyectar BSA carboximetilada (tiempo de incubación con ácido glioxílico y cianoborohidruro sódico 24 horas) (CG-FID)	120

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
13 Cromatograma obtenido al inyectar papilla B (con miel) almacenada 9 meses a 37°C (CG-FID)	121
14 Cromatograma CG-MS de los N-tert-butildimetilsilil derivados de CML y LAL	123
15 Espectros de masas de los N-tert-butildimetilsilil derivados de CML	124
16 Espectro de masas del N-tert-butildimetilsilil derivado de LAL	125
17 Espectro de masas del N-tert-butildimetilsilil derivado de CHPL	125
18 Estructura de la CML, LAL y Lys derivatizadas	128
19 Relación entre la respuesta (medida como áreas de los picos) y la concentración de CML	147
20 Perfil aminoacídico de las PCL analizadas (A, B y C) y de la leche	150
21 Furosina. Interacciones tiempo de almacenamiento-temperatura y tiempo de almacenamiento-tipo de muestra	161
22 Valores observados frente a predichos para la furosina y ecuación de regresión múltiple obtenida	162
23 Compuestos fluorescentes. Interacciones temperatura de almacenamiento - tipo de muestra	174
24 Compuestos fluorescentes. Interacciones tiempo de almacenamiento - tipo de muestra	175
25 Valores observados frente a predichos para AGEs libres y totales y ecuaciones de regresión múltiple obtenidas	178

---

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
26	Valores observados frente a predichos para pentodil-lisina libre y total y ecuaciones de regresión múltiple obtenidas	179
27	$\Delta E$ en las tres PCL analizadas	182
28	Color $\Delta E$ . Interacción tiempo de almacenamiento-tipo de muestra	183
29	Valores observados frente a predichos para el $\Delta E$ y ecuación de regresión múltiple obtenida	185
30	Formación de CML en sistemas modelo	190



**ABREVIATURAS**

AAbA	Ácido L- $\alpha$ -amino-n-butírico
AGEs	Advanced glycation end products o productos de glicación de las etapas avanzadas de la RM
AI	Ingesta adecuada
ANOVA	Análisis de la varianza
AQC	6-Aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato
A <sub>w</sub>	Actividad de agua
BSA	Albumina bovina sérica
CG	Cromatografía de gases
CHPL	N <sup>ε</sup> -(1-(carboxi-3-hidroxi-propil)-L-lisina)
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CML	Carboximetil-lisina
C-PER	Coefficiente de eficacia proteica calculado
CV	Coefficiente de variación
DAP	Ácido 2,6-diaminopimélico
DRI	Ingestas dietéticas de referencia
EAR	Requerimiento medio estimado
EI	Impacto electrónico
ESPGAN	Sociedad Europea de Nutrición y Gastroenterología Pediátrica
F	Factor de respuesta
FAO	Food and Agriculture Organization
FID	Detector de ionización de llama

FMOC	9-Fluorenilmetil-cloroformato
FNB	Food and Nutrition Board
HAL	Histidinoalanina
HMF	Hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furfuraldehído)
IF	Intensidad de fluorescencia
LAL	Lisinoalanina
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
3-MPA	3-Ácido mercaptopropiónico
MS	Espectrometría de Masas
MTBSTFA	N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida
ND	No detectado
NPR	Coficiente proteico neto
NPU	Utilización neta proteica
ODS	Octadecil sílice
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA	O-ftalaldehido
p	Nivel de significación
PCL	Papillas de cereales con leche
PDCASS	Índice químico corregido por la digestibilidad
PER	Coficiente de eficacia proteica
PITC	Fenilisotiocianato
PRM	Productos de la reacción de Maillard
r	Coficiente de correlación
RAGE	Receptor para AGEs
RD	Real Decreto
RDA	Ingesta dietética recomendada
X	

---

RM	Reacción de Maillard
tBDMSi	N-tert-butildimetilsilil
TCA	Ácido tricloroacético
UL	Ingesta máxima tolerable
VB	Valor biológico

*Abreviaturas de los aminoácidos*

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparragina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina



## Objeto del trabajo

---



## **OBJETO DEL TRABAJO**

Los tratamientos tecnológicos (en especial los térmicos) y el almacenamiento pueden modificar el valor nutritivo de los alimentos infantiles, debido a interacciones entre los componentes que los constituyen. La reacción de Maillard (RM), que afecta a los carbohidratos y las proteínas, es de especial interés, porque provoca una disminución del valor nutritivo, puede originar compuestos antinutritivos y tóxicos y modifica las propiedades organolépticas y funcionales del alimento. Este hecho tiene mayor importancia en este tipo de alimentos, cuyo consumo va en aumento en países industrializados, ya que están destinados a un grupo de población con elevados requerimientos proteicos.

El conocimiento del alcance de la RM en los alimentos infantiles permite predecir los cambios que sufren durante los tratamientos utilizados en su elaboración y durante su posterior almacenamiento, y por lo tanto, controlar y optimizar los procesos para obtener productos de mejor calidad.

El objeto final del trabajo es contribuir a un mejor conocimiento del alcance de la RM en papillas de cereales con leche (PCL) listas para el consumo, que permita evaluar la calidad nutritiva/ proteica de este tipo de productos.

Se pretende alcanzar los siguientes objetivos concretos:

I. La optimización y validación de métodos para la determinación de compuestos indicadores de la evolución de la RM.

II. El estudio de la evolución de la RM durante un período de almacenamiento de 9 meses, así como la influencia de las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) sobre las etapas iniciales, avanzadas y finales de la RM.

Este trabajo se encuadra dentro de un proyecto más amplio cuyo objeto es la búsqueda de indicadores de rutina que permitan evaluar y estudiar la estabilidad de las fracciones proteica y lipídica de PCL listas para el consumo durante el período de vida útil.

## Plan de trabajo

---



## PLAN DE TRABAJO

Para alcanzar los objetivos mencionados se propone un plan de trabajo que consta de las siguientes etapas:

1. Optimización y validación de métodos para la determinación de compuestos indicadores de la evolución de la RM en PCL listas para el consumo.
  - 1.1. Puesta a punto y validación de un método de determinación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa.
  - 1.2. Adaptación a las muestras problema de métodos de determinación de furosina y compuestos fluorescentes (*advanced glycation end products* o AGEs) puestos a punto y validados en fórmulas para lactantes en trabajos previos.
  - 1.3. Puesta a punto y validación de un método de determinación de carboximetil-lisina (CML) por cromatografía de gases (CG).
2. Estudio de la evolución de la RM durante 9 meses de almacenamiento. Influencia de las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) sobre las etapas iniciales, avanzadas y finales de la RM.
  - 2.1. Determinación de los aminoácidos proteinogénicos en la muestras objeto de estudio.
  - 2.2. Diseño del muestreo: selección de las temperaturas y tiempos de muestreo durante el almacenamiento de las muestras.

- 2.3. Determinación de furosina como indicador de las etapas iniciales de la RM y de AGEs y color como parámetros indicadores de las etapas avanzadas y finales, respectivamente, en las muestras objeto de estudio.
- 2.4. Tratamiento estadístico de los resultados para evaluar la influencia de las condiciones de almacenamiento en el desarrollo de la RM y estabilidad proteica de las muestras estudiadas.
3. Aplicación del método de determinación de CML a alimentos de distinta naturaleza, incluyendo las PCL.
4. Redacción de la memoria.

## Introducción

---



## **1. ALIMENTACIÓN INFANTIL**

### **1.1. Alimentación en la lactancia y en la infancia**

La alimentación durante la lactancia y el período de destete es esencial para asegurar un buen crecimiento y desarrollo del lactante y para mantener su salud. Además, una nutrición adecuada es crucial para el bienestar a largo plazo y la calidad de vida (Bueno y Bueno, 2003; Dupont, 2003).

Crecimiento y nutrición están estrechamente relacionados, hasta el punto que la malnutrición crónica es, a nivel mundial, la causa más frecuente de bajo crecimiento. En cambio, el consumo de una dieta más energética y rica en proteínas ha sido uno de los factores responsables del aumento de talla y de la aceleración del ritmo madurativo que se ha producido en los países desarrollados en los últimos cien años (Hernández, 1999).

En el recién nacido y durante el primer año de vida, los órganos encargados de la digestión de los alimentos y absorción de los nutrientes se encuentran en un proceso de maduración, siendo menos eficientes. Además, la regulación del metabolismo hidromineral y del equilibrio térmico es más imperfecta que en el adulto, por lo que la nutrición es un proceso más vulnerable. Así, para mantener un estado nutricional satisfactorio y un ritmo de crecimiento normal, la dieta debe adecuarse a

la capacidad digestivo-metabólica y a las necesidades fisiológicas cambiantes a lo largo de la lactancia y la infancia (Hernández, 1999).

En la alimentación del niño en el primer año de vida, se diferencian dos etapas bien definidas. La primera, durante los 5 o 6 primeros meses, comporta la utilización de un régimen lácteo en exclusiva. La segunda, que va del 5º o 6º mes de vida hasta el año de edad, continúa incluyendo productos lácteos en una gran medida, pero asocia ya, a estos últimos, una variada gama de otros alimentos (Casado de Frías et al., 1993; Martínez y Hernández, 1993).

1.1.1. Alimentación durante los primeros 5 o 6 meses (Casado de Frías et al., 1993; Martínez y Hernández, 1993; Ronayne de Ferrer, 1995; Nasirpour et al., 2006)

El alimento ideal en esta etapa es la leche materna, ya que aporta los nutrientes necesarios y en las cantidades adecuadas, existe una adecuación entre lo que el niño recibe y lo que es capaz de digerir, absorber y eliminar y contiene una serie de factores dotados con propiedades antiinfecciosas.

Aunque la lactancia natural es la ideal para el niño, es evidente que se precisan otras alternativas para aquellos casos en los que no es posible o en los que el suministro de la misma es insuficiente. La lactancia artificial es una alternativa, para lo que se utilizan *fórmulas de inicio*, que cubren las necesidades del lactante durante los primeros 4 o 6 meses de vida, aunque también pueden usarse conjuntamente con otros alimentos hasta el año de edad.

Las fórmulas para lactantes se preparan, habitualmente, a partir de leche de vaca, modificando su composición para intentar proporcionar al niño un producto que sea lo más parecido posible a la leche de mujer. No es posible conseguir un producto idéntico porque no pueden incluirse las células dotadas de actividad ni los componentes que todavía se desconocen.

Se dispone también de fórmulas para lactantes con intolerancia a la lactosa, que se preparan a partir de leche de vaca sustituyendo la lactosa por otros hidratos de carbono, como las maltodextrinas o polímeros de glucosa.

En los casos en que los lactantes presentan reacciones adversas a la leche de vaca, se pueden utilizar fórmulas basadas en la proteína de soja. Estas fórmulas también pueden estar indicadas cuando se requiere una dieta sin lactosa y/o galactosa o en el caso de familias vegetarianas. La proteína de soja no puede utilizarse en lactantes que muestran alergia a la misma, en cuyo caso se usan fórmulas a base de hidrolizados proteicos (de caseína o de proteínas del suero), denominadas fórmulas hipoalergénicas.

Se dispone asimismo de fórmulas especiales para lactantes prematuros con mayor contenido proteico y mineral, además de mayor densidad energética, que contienen parte de la fracción grasa en forma de triglicéridos de cadena media; así como fórmulas especiales para lactantes con errores congénitos de metabolismo.

### 1.1.2. Alimentación desde el 5º-6º mes de vida hasta el año de edad

Se aconseja la utilización de leche materna o fórmula como alimento fundamental hasta el año de edad, pero a partir del 5º o 6º mes de vida, se deben introducir otros alimentos para cumplimentar los aportes nutricionales. Los requerimientos hídricos disminuyen ligeramente y el uso de alimentos sólidos o semisólidos permite mantener el aporte energético sin aumentar el volumen de la dieta. Además, la capacidad digestiva ha mejorado y la función renal ha madurado (Casado de Frías et al., 1993).

Los alimentos distintos a la leche materna y a la fórmula que recibe el lactante después del 5º o 6º mes, se denominan *alimentación complementaria, adicional* o *Beikost*, y se caracterizan por el aporte de alimentos sólidos o semisólidos proporcionados diariamente de forma regular y en cantidades significativas (Pérez-Chóliz, 2003).

La diversificación de los alimentos orienta y educa el gusto del niño hacia alimentos que formarán parte, posteriormente, de su dieta habitual, y permite proporcionar otros compuestos, como son las fibras, e incrementar el contenido de algunos otros, como el hierro o las vitaminas, de las que el niño está necesitado a partir del tercer mes. Se inicia la masticación y el uso de utensilios para comer (Casado de Frías et al., 1993).

La introducción de cualquiera de los alimentos debe ser lenta y progresiva. El destete no supone un cese brusco del aporte de leche materna o de fórmula, sino que se trata de un periodo de transición en el

que se reducen de forma progresiva el número de tomas y se introducen alimentos no lácteos (Pérez-Chóliz, 2003).

Las papillas a base de cereales suelen ser el primer alimento sólido que recibe el lactante. Tienen un contenido elevado de hidratos de carbono y son, por tanto, muy energéticas. Contribuyen al suministro de proteínas, minerales, vitaminas y ácidos grasos esenciales (Martínez y Hernández, 1993).

Las frutas, hortalizas, legumbres y carnes pueden introducirse en la dieta a partir del sexto mes. El pescado debe introducirse a partir de los diez meses de edad y el huevo a partir de los once meses, por su elevada capacidad antigénica (Martínez y Hernández, 1993).

Puesto que la leche debe ser el alimento básico y la leche materna pocas veces se mantiene en la cantidad necesaria hasta el fin del primer año, se hace indispensable el empleo de *fórmulas de continuación*, en general, a base de leche de vaca. La leche de vaca entera no se recomienda hasta el año de edad, para evitar la ferropenia, la deshidratación debida a una elevada carga renal de solutos, posibles deficiencias de nutrientes y mayor riesgo de alergia alimentaria (Bueno y Bueno, 2003).

1.1.3. Alimentación a partir del primer año de vida (Casado de Frías et al., 1993; Martínez y Hernández, 1993)

La alimentación correcta a partir del primer año de vida se basa en el consumo de una dieta equilibrada que asegure un crecimiento y

desarrollo óptimos, evite carencias nutricionales y prevenga enfermedades del adulto, como las cardiovasculares o la obesidad.

La definición de la alimentación en la lactancia es más fácil al disponer de un patrón de referencia como el de la leche materna. Las recomendaciones para etapas posteriores proceden de estudios realizados en poblaciones de niños sanos con un patrón de crecimiento normal, aconsejando un margen de seguridad para cubrir variaciones biológicas y ambientales.

Desde hace unos años se comercializa un tipo de leches infantiles denominadas *leche de crecimiento, tipo 3 o junior*, de composición intermedia entre las fórmulas de continuación y la leche de vaca, destinadas a niños con más de un año de edad.

## **1.2. Tipos de alimentos infantiles comerciales utilizados en la alimentación complementaria o Beikost**

Las papillas de cereales son uno de los primeros alimentos que se introducen en la alimentación complementaria. En la actualidad no suelen prepararse en casa, pues se dispone de preparados comerciales que se presentan de distintas maneras, por ejemplo, con o sin adición de leche. El tipo de cereales a utilizar es variable, puede usarse uno sólo o varios simultáneamente. En España, los que se utilizan con mayor frecuencia son el trigo, la avena, la cebada, el centeno, el arroz y el maíz. Los cuatro primeros son cereales con gluten y no deben administrarse hasta después del sexto mes; mientras que el arroz y el maíz son cereales sin gluten y podrían utilizarse a partir del cuarto mes (aunque es preferible iniciar su

administración a partir del sexto). Normalmente, los cereales de estos preparados comerciales se tratan previamente con la acción del calor o de enzimas para facilitar la digestión e incorporación a la leche, fórmula, agua o caldo (Casado de Frías et al., 1993; Martínez y Hernández, 1993).

Las frutas también son alimentos de introducción temprana en la alimentación complementaria a modo de purés, mezclando y triturando varias frutas o en forma de zumos. El plátano, la manzana y la naranja suelen ser las frutas más utilizadas.

Los purés de verduras son, generalmente, el tercer alimento que se ofrece en la alimentación complementaria. Éstos pueden enriquecerse más adelante con una pequeña cantidad de legumbres cocidas. La incorporación de proteínas de alto valor biológico, como carne, pescado o huevo, se realiza en el momento oportuno adicionándolas a los purés. En muchas ocasiones estos alimentos se preparan en casa, pero cada vez es más frecuente utilizar productos comerciales (tarritos), que asocian vegetales o cereales con carne o pescado, y se elaboran con diversas texturas y adaptados a las distintas edades (Casado de Frías et al., 1993).

El consumo de alimentos infantiles elaborados en la industria ha aumentado de forma extraordinaria en los países industrializados en las dos últimas décadas. Existen en el mercado más de 300 variedades diferentes de alimentos infantiles, que pueden contener cereales, productos lácteos, fruta, verduras, carne, pescados y huevos (Hernández, 1999).

En España, el mercado de alimentos infantiles registra en la actualidad las mayores tasas de crecimiento dentro de la alimentación no perecedera, alrededor de un 12% en la distribución moderna, donde llegan hasta las 47.550 toneladas. La distribución por productos se representa en la figura 1 (Mercasa, 2006).

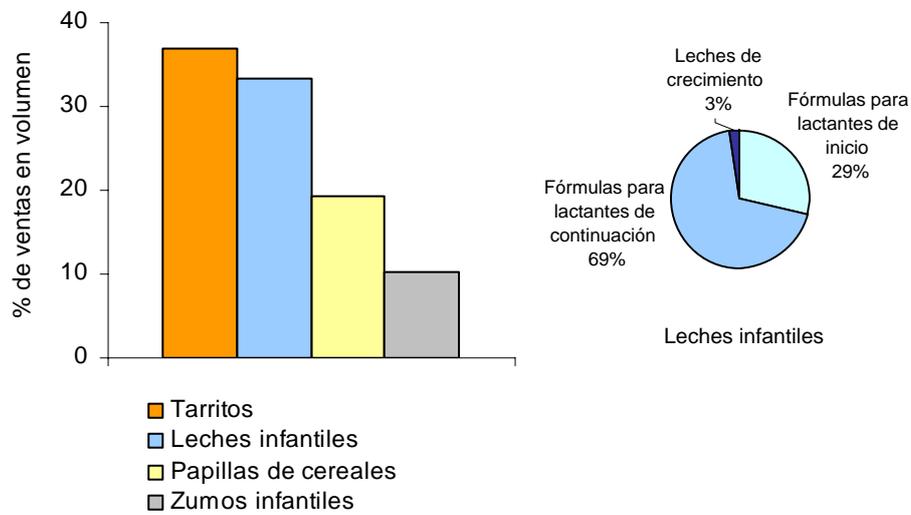
Además de los productos clásicos, otros productos infantiles, como las galletas, los yogures y las infusiones, se usan cada vez más en la alimentación infantil (Mercasa, 2005).

En España, un recién nacido consume como promedio, alrededor de 30 kilos de fórmulas para lactantes, 35 kilos de papillas y unos 43 kilos de tarritos. Estos valores son similares a los de otros países del entorno, excepto el valor para los tarritos, que es relativamente bajo (Mercasa, 2006).

### **1.3. Legislación**

Los alimentos a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes (niños menores de 12 meses) y niños de corta edad (niños entre 1 y 3 años de edad) vienen regulados por la Directiva 2006/125/CE, de 5 de diciembre de 2006, que deroga la anterior, modificada en diversas ocasiones [Directiva 96/5/CE, de 16 de febrero (*Real Decreto (RD) 490/1998, de 27 de marzo*), actualizada mediante la Directiva 98/36/CE de 2 de junio (*Orden de 14 de julio de 1999*) y modificada por la Directiva 99/39/CE, de 6 de mayo (*RD 1445/2000, de 31 de julio*) y la Directiva 2003/13/CE, de 10 de febrero (*RD 480/2004, de 26 de marzo*)].

Figura 1. Mercado de alimentos infantiles en España (Mercasa, 2006).



Son productos alimenticios destinados a una alimentación especial, que satisfacen las necesidades específicas de los lactantes y niños de corta edad en buen estado de salud, destinados a los lactantes durante el período de destete y a los niños de corta edad, como complemento de su dieta y/o para su progresiva adaptación a los alimentos normales. Se clasifican en dos grupos:

1. *Alimentos elaborados a base de cereales*, que se dividen en las cuatro categorías siguientes:

- a. Cereales simples reconstituidos o que deben reconstituirse con leche u otro líquido alimenticio adecuado.

- b. Cereales con adición de otro alimento rico en proteínas reconstituidos o que deben reconstituirse con agua u otro líquido que no contenga proteínas.
- c. Pastas que se deben cocer en agua hirviendo o en otros líquidos apropiados antes de su consumo.
- d. Bizcochos y galletas que pueden consumirse directamente o, una vez pulverizados, con adición de agua, leche u otro líquido adecuado.

Los alimentos elaborados a base de cereales se prepararán a partir de uno o varios cereales o raíces feculentas, previamente triturados. La cantidad de cereal y/o raíz feculenta será como mínimo del 25% en peso de la mezcla final seca.

*2. Alimentos infantiles* distintos de los alimentos elaborados a base de cereales.

Los alimentos elaborados a base de cereales y los alimentos infantiles se fabrican con ingredientes cuya adecuación a la alimentación especial de los lactantes y niños de corta edad haya sido determinada mediante datos científicos generalmente aceptados. La Directiva regula la composición de estos alimentos, las sustancias nutritivas que pueden adicionarse en su fabricación y el límite máximo, así como el etiquetado.

No pueden contener ninguna sustancia en cantidad tal que ponga en peligro la salud de los lactantes y niños de corta edad. Así, se especifican los límites máximos de residuos de plaguicidas o de metabolitos de plaguicidas en el producto listo para el consumo o

reconstituido conforme a las instrucciones del fabricante, así como los plaguicidas que no se pueden utilizar en los productos agrícolas destinados a la elaboración de estos alimentos.

La edad a partir de la cual pueden consumirse estos alimentos es de cuatro meses como mínimo.

Las papillas de cereales con leche (PCL), objeto de este estudio, se integran en la categoría 1.b (alimentos elaborados a base de cereales con adición de otro alimento rico en proteínas). Su composición en proteínas, hidratos de carbono y lípidos, debe adaptarse a los siguientes criterios:

- El contenido en proteínas será como máximo de 5.5 g/100 kcal.

- Se deberán añadir como mínimo 2 g/100 kcal de proteínas.

- El índice químico de las proteínas añadidas será equivalente como mínimo al 80% de la proteína de referencia (caseína) o el coeficiente de eficacia proteínica en la mezcla será equivalente como mínimo al 70% de la proteína de referencia. En el cuadro 1 se indica la composición de aminoácidos de la caseína.

- Si se añade al producto sacarosa, fructosa, glucosa, jarabe de glucosa o miel, la cantidad de hidratos de carbono procedente de estas fuentes no será superior a 5 g/100 kcal. La cantidad de fructosa añadida no será superior a 2.5 g/100 kcal.

- El contenido en lípidos será como máximo 4.5 g/100 kcal.

Cuadro 1. Composición de aminoácidos de la caseína.

	<u>g/100g caseína</u>		<u>g/100g caseína</u>
Arginina	3.7	Metionina	2.8
Cistina	0.3	Fenilalanina	5.2
Histidina	2.9	Treonina	4.7
Isoleucina	5.4	Triptófano	1.6
Leucina	9.5	Tirosina	5.8
Lisina	8.1	Valina	6.7

---

## **2. IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS EN LA ALIMENTACIÓN DEL LACTANTE Y NIÑO DE CORTA EDAD**

La infancia es la etapa de la vida en la que se tienen los requerimientos proteicos más elevados, ya que deben cubrirse las necesidades de mantenimiento y de formación de tejidos (Dupont, 2003).

Los alimentos infantiles deben proporcionar los nutrientes en cantidad suficiente para permitir un desarrollo y crecimiento óptimos y prevenir enfermedades. Las dietas deficientes en uno o varios aminoácidos esenciales no permiten un crecimiento normal y requieren un suplemento proteico adecuado (Casado de Frías et al., 1993; Martínez y Hernández, 1993).

La Directiva 2006/125/CE y el Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Nutrición y Gastroenterología Pediátrica (ESPGAN, 1981) han establecido unas pautas sobre el contenido proteico y los requerimientos de la composición de aminoácidos que deben cumplir los alimentos infantiles a base de cereales, tomando como referencia la caseína.

### **2.1. Requerimientos y recomendaciones de proteínas y aminoácidos**

Las proteínas y otros componentes nitrogenados del organismo están en continua degradación y síntesis. Cuando el individuo se encuentra en la etapa de crecimiento, se utilizan proteínas en la síntesis

tisular y además, aumenta la proporción de proteínas en degradación y síntesis. La cantidad de proteínas que se renueva diariamente en el organismo es varias veces superior a la ingesta habitual, por lo tanto, la reutilización de los aminoácidos es una característica fundamental de la economía del metabolismo proteico. Sin embargo, algunos aminoácidos se pierden en el catabolismo oxidativo, eliminándose con la orina sus productos metabólicos (urea, creatinina, ácido úrico y otras sustancias nitrogenadas); también se pierde nitrógeno con las heces, el sudor y otras secreciones corporales, así como con la piel, el pelo y las uñas. Por lo tanto, además de los requerimientos proteicos para la formación de tejidos en la etapa de crecimiento se necesita un aporte continuado de aminoácidos a través de la dieta para reemplazar estas pérdidas.

Si la ingesta de aminoácidos es superior a la necesaria para la síntesis de los componentes nitrogenados titulares y la reposición de las pérdidas, el exceso no se almacena sino que se degrada excretándose el nitrógeno en forma de urea, mientras que los cetoácidos se utilizan directamente como fuente energética o se transforman en hidratos de carbono o grasa.

En general, la deficiencia de proteínas va acompañada de deficiencia de energía y otros nutrientes, debido a una ingesta insuficiente de alimentos. Cuando la ingesta proteica es baja se producen cambios físicos (baja estatura, musculatura escasa, edema, cabello fino y frágil, lesiones cutáneas) y bioquímicos (disminución de la albúmina sérica y desequilibrios hormonales) (FAO/OMS, 1985; FNB, 2005).

Desde el punto de vista nutricional, los aminoácidos pueden clasificarse en tres grupos (FNB, 2005):

- *Esenciales* (His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp y Val). El hombre no puede sintetizarlos y debe recibirlos a través de la dieta. Si ésta no incluye los aminoácidos esenciales, disminuye la síntesis proteica y se produce rápidamente un balance negativo de nitrógeno. En el caso de la His, un aporte insuficiente lleva de forma progresiva hacia un balance negativo, ello hace que los síntomas carenciales aparezcan de forma lenta. Cuando se reintroduce His en la dieta el balance nitrogenado pasa rápidamente a un valor positivo.

- *No esenciales* (Ala, Asp, Asn, Glu y Ser). Pueden sintetizarse en el organismo a partir de otros aminoácidos u otros metabolitos nitrogenados.

- *Semiesenciales* (Arg, Cys, Tyr, Gln, Gly y Pro). Se sintetizan a partir de otros aminoácidos, pero su síntesis está limitada en lactantes prematuros y en determinadas condiciones fisiopatológicas, situaciones en las que no se dispone de cantidad suficiente de sus precursores y/o las actividades enzimáticas implicadas no son suficientes para promover su síntesis en proporciones significativas.

Se establecen requerimientos dietéticos de aminoácidos para los aminoácidos esenciales y los semiesenciales Cys y Tyr, cuyas necesidades se suman a las de Met y Phe, respectivamente (aminoácidos precursores), ya que gran parte de los requerimientos de Met pueden sustituirse por Cys (o cistina) y los de Phe por Tyr, y viceversa (Cheftel et al., 1993).

### 2.1.1. Criterios para determinar las necesidades proteicas

Las necesidades proteicas de los distintos grupos de población se estiman a partir de estudios basados en dos metodologías (FNB, 2005):

a) *Método factorial*. Se basa en la determinación de la pérdida obligatoria de nitrógeno, es decir, la pérdida de nitrógeno en una persona a la que se le suministra una dieta que aporta la energía necesaria pero carece de proteínas. Se valora la cantidad de proteínas que debe suministrarse para reponer las pérdidas (orina, heces, sudor y otras secreciones corporales), es decir, para alcanzar un equilibrio de nitrógeno (balance cero). En niños y mujeres embarazadas y en período de lactancia, se incorporan al cálculo factorial los requerimientos correspondientes a una cantidad adicional de proteínas para el crecimiento hístico y la formación de leche.

El problema de este método es que la relación entre la ingesta proteica y la retención de nitrógeno no es exactamente lineal.

b) *Método del balance de nitrógeno*. Es el método clásico que se considera más satisfactorio. El balance de nitrógeno es la diferencia entre la ingesta de nitrógeno y la cantidad excretada por orina, heces, piel, y otras pérdidas incluyendo el sudor. Las necesidades se calculan interpolando o extrapolando los datos de balance de nitrógeno hasta el punto de equilibrio cero en los adultos, o hasta un valor determinado de equilibrio positivo en los niños, para permitir el crecimiento.

Los balances de nitrógeno son positivos (ingesta mayor que pérdida) siempre que en el organismo se produzca un crecimiento neto (recién nacido, niños, embarazo, etc.) o tengan lugar procesos de regeneración tisular en el adulto. Se producen balances de nitrógeno negativos en situaciones de ayuno y en estados patológicos, tales como quemaduras, infecciones, fiebre, etc. También pueden presentarse cuando se excluyen de la dieta uno o más aminoácidos esenciales. Así, en la determinación de las necesidades proteicas por este método, se utilizan proteínas de alta calidad para evitar balances negativos producidos por una limitación en el aporte de aminoácidos esenciales.

Una limitación práctica de este método, así como del método factorial, es que las pérdidas de nitrógeno por la piel y el sudor deben incluirse en el cálculo, y, además de la dificultad para realizar estas medidas, éstas varían con los factores medioambientales, como la temperatura.

Para lactantes de 0-6 meses, la ingesta recomendada de proteínas se obtiene considerando que durante este período de vida la leche humana es la principal fuente de nutrientes y no existen casos de niños a término sanos y alimentados únicamente con leche humana que manifiesten signos de deficiencia de estos nutrientes. Se considera para el cálculo una ingesta de leche de 0.78 L/día, un promedio proteico de 11.7 g/L, y un peso de referencia de 6 kg de 2 a 6 meses.

En los cuadros 2 y 3 se recogen las ingestas dietéticas de referencia (DRIs: *dietary reference intakes*) de las proteínas para lactantes

y niños de corta edad propuestas por el FNB (2005) y los requerimientos propuestos por la FAO/OMS (1985), respectivamente.

Las DRIs comprenden un conjunto de valores de referencia para nutrientes específicos. Incluyen las siguientes categorías: el requerimiento medio estimado (EAR: *estimated average requirement*), la ingesta dietética recomendada (RDA: *recommended dietary allowance*), la ingesta adecuada (AI: *adequate intake*) y la ingesta máxima tolerable (UL: *tolerable upper intake level*). El EAR de un nutriente determinado es la ingesta media diaria que se estima que cubre las necesidades de la mitad de individuos sanos de un determinado sexo y en una etapa particular de la vida. La RDA de un nutriente es la ingesta media diaria suficiente para cubrir las necesidades de prácticamente todos (el 97-98%) los individuos sanos en una etapa particular de la vida y para un sexo determinado. La AI de un nutriente es la ingesta media diaria recomendada, basada en ingestas estimadas o determinadas experimentalmente para un grupo (o grupos) de población aparentemente sana, y que se considera adecuada. Se utiliza la AI cuando no es posible determinar la RDA. La UL es la mayor ingesta diaria de nutriente que no supone riesgo para la salud de casi todos los individuos de una población. Cuando la ingesta supera la UL, aumenta el riesgo de efectos adversos.

Cuadro 2. Ingestas dietéticas de referencia de proteínas (g/kg/día) para lactantes y niños de corta edad según FNB (2005).

Edad	EAR	RDA
0-6 meses	1.52 <sup>a</sup>	
7-12 meses	1.0	1.2
1-3 años	0.87	1.05

<sup>a</sup>AI: Ingesta adecuada

EAR: Requerimiento medio estimado

RDA: Ingesta dietética recomendada

Cuadro 3. Requerimientos estimados de proteínas (g/kg/día) para lactantes y niños de corta edad según FAO/OMS (1985).

Edad	Ingesta proteica
3-6 meses	1.86
6-9 meses	1.65
9-12 meses	1.47
1-2 años	1.23
2-3 años	1.15

### 2.1.2. Criterios para determinar las necesidades de aminoácidos

Se dispone de distintos métodos para estimar los requerimientos de los aminoácidos esenciales (FNB, 2005):

a) *Método del balance de nitrógeno*. Es el método clásico. Se realizan estudios individuales para cada aminoácido con distintos aportes.

En el caso de la histidina no es aplicable, ya que una dieta que carece de este aminoácido o que proporciona cantidades inferiores a los requerimientos no provoca un balance negativo de nitrógeno hasta pasados 56 días o más. Tampoco es útil para la isoleucina.

b) *Método de la respuesta del aminoácido en plasma.* Este fue el primer método en considerar la fisiología de los aminoácidos individuales. La ingesta de un determinado aminoácido en cantidad inferior a su requerimiento, produce una concentración plasmática baja que es relativamente insensible a cambios en la ingesta. Cuando el contenido del aminoácido en la dieta se incrementa y se alcanza el requerimiento, las concentraciones plasmáticas comienzan a aumentar de forma progresiva. Así, se considera que la cantidad requerida del aminoácido en cuestión es aquella ingesta mínima de aminoácido a partir de la cual comienza a aumentar su concentración plasmática.

El principal problema de este método es que el metabolismo de los aminoácidos es muy complejo y, además de la cantidad de aminoácido ingerida, otros factores, como el tiempo de vaciado gástrico, pueden influir en su concentración en plasma. Además, la relación entre la ingesta del aminoácido y su concentración en plasma no es necesariamente lineal, con lo que es difícil determinar la ingesta mínima para la que las concentraciones constantes en plasma comienzan a aumentar.

En los últimos años, los métodos que se citan a continuación han reemplazado al método de la respuesta del aminoácido en plasma.

c) *Método directo de la oxidación del aminoácido.* La esencialidad nutricional de un aminoácido está en función de la incapacidad del organismo para la síntesis de su esqueleto carbonado. Así, si el aminoácido se marca con  $^{13}\text{C}$ , la producción respiratoria de  $^{13}\text{CO}_2$  será un buen indicador de la pérdida oxidativa irreversible del mismo. En este método se determina la relación entre el catabolismo del carbono del aminoácido (medido como  $^{13}\text{CO}_2$  respirado) y su ingesta. Se considera que una ingesta inferior al requerimiento proporciona un porcentaje de oxidación bajo y constante, pero, una vez se alcanza el requerimiento, la oxidación del aminoácido aumenta de forma progresiva.

Aunque este método presenta ventajas respecto a los anteriores, también tiene limitaciones. El principal problema es que, para determinar el punto a partir del cual comienza a aumentar la oxidación del aminoácido, debe realizarse la prueba a ingestas muy bajas de éste, con lo que la administración del aminoácido marcado llega a ser significativa en relación al ingerido en la dieta. Esto puede inducir a una sobreestimación de la oxidación del aminoácido, que se basa en la producción de  $\text{CO}_2$  marcado. La segunda limitación del método es que sólo puede utilizarse con exactitud para aquellos aminoácidos cuyo grupo carboxilo se libera directamente al organismo.

d) *Método del balance del aminoácido en 24 horas.* En la estimación de los requerimientos por el método directo de la oxidación del aminoácido se realizan las medidas en períodos de ingesta, pero no de ayuno. Por ello se desarrolla el método del balance del aminoácido en 24 horas para contemplar las diferentes situaciones nutricionales.

El problema de este método, además de aquellos relacionados con la base teórica de la medida, es que requiere mucho trabajo.

e) *Método de la oxidación del aminoácido indicador*. Se basa en medidas de la oxidación de un aminoácido no limitante que se toma como indicador. Cuando se ingiere un único aminoácido esencial en cantidad inferior a su requerimiento, disminuye la capacidad de retención de otros aminoácidos no limitantes (incluyendo el indicador) que están entonces en exceso y se oxidan. Cuando el aminoácido esencial en cuestión no se ingiere, la retención proteica es mínima y la oxidación del indicador es máxima. Cuando la ingesta del aminoácido esencial aumenta, la retención proteica se incrementa y la oxidación del indicador disminuye hasta que se alcanza el requerimiento del aminoácido esencial, a partir de lo cual la oxidación del aminoácido indicador es menor y constante. El requerimiento del aminoácido se corresponde con el aporte al que la oxidación del aminoácido indicador empieza a ser constante.

Este método presenta ventajas frente al método directo de la oxidación del aminoácido. La primera es que las restricciones metabólicas de la liberación del CO<sub>2</sub> se aplican sólo al aminoácido indicador, con lo que puede utilizarse para todos los aminoácidos. Además, la cantidad del aminoácido indicador no cambia radicalmente cuando varía la ingesta del aminoácido que se estudia.

Todavía sigue en estudio la elección del mejor aminoácido indicador, hasta el momento se han utilizado como aminoácidos indicadores la fenilalanina y la lisina. Por otra parte, el método no

contempla situaciones de ayuno, por lo que se ha desarrollado un método de medida durante 24 horas.

Para lactantes de 0-6 meses, la ingesta recomendada de aminoácidos se obtiene a partir de la composición de la leche humana. En el caso de lactantes de más de 6 meses y niños de corta edad, los requerimientos de aminoácidos se han determinado mediante el método del balance de nitrógeno, pero recientemente se han utilizado otros métodos, como el de la oxidación del aminoácido indicador (Pencharz y Ball, 2004).

En los cuadros 4 y 5 se recogen las DRIs de los aminoácidos propuestas por FNB (2005) y los requerimientos propuestos por la FAO/OMS (1985), respectivamente, para lactantes y niños de corta edad.

## **2.2. Evaluación de la calidad proteica**

La calidad de una fuente proteica expresa su capacidad para proporcionar el nitrógeno y los aminoácidos requeridos para la síntesis y el mantenimiento de las proteínas del organismo. En la práctica, la calidad proteica está determinada por la composición aminoacídica y la digestibilidad y biodisponibilidad de la proteína en cuestión (Hernández et al., 1996).

Cuadro 4. Requerimiento estimado medio (EAR) e ingesta dietética recomendada (RDA) de aminoácidos (mg/kg/día) para lactantes y niños de corta edad según FNB (2005).

Edad	<i>Categoría de DRI</i>	<i>Categoría</i>								
		His	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Phe+Tyr	Thr	Trp	Val
0-6 meses	AI	36	88	156	107	59	135	73	28	87
	EAR	22	30	65	62	30	58	34	9	39
7-12 meses	RDA	32	43	93	89	43	84	49	13	58
	EAR	16	22	48	45	22	41	24	6	28
1-3 años	RDA	21	28	63	58	28	54	32	8	37

AI: Ingesta adecuada

Cuadro 5. Estimación del requerimiento de aminoácidos (mg/kg/día) para lactantes y niños de corta edad según FAO/OMS (1985).

Edad	His	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Phe+Tyr	Thr	Trp	Val
3-4 meses	28	70	161	103	58	125	87	17	93
2 años		31	73	64	27	69	37	12.5	38

El primer factor que determina la utilización de las proteínas de la dieta es el grado en que se hidrolizan en el tracto digestivo. En ello influye su configuración y, por tanto, su solubilidad y el hecho de que en los alimentos estén combinadas con lípidos, metales, ácidos nucleicos o hidratos de carbono. La digestión de las proteínas comienza en el estómago, donde se libera ácido clorhídrico y pepsina, y a continuación, en el intestino, se exponen a una gran cantidad de enzimas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas y aminopeptidasas). Los aminoácidos libres y péptidos de cadena corta liberados se absorben en el intestino delgado; pero una pequeña parte pasa al intestino grueso, donde gracias a la acción bacteriana se transforman en metabolitos que pueden finalmente absorberse. La absorción se realiza mediante transportadores activos específicos para aminoácidos ácidos, básicos o neutros, y dentro de cada grupo, se capta en primer lugar el que se encuentre antes disponible. El exceso de un aminoácido con alta afinidad por el transportador puede inhibir la absorción de los otros aminoácidos del grupo.

Además de la cantidad que se digiere y absorbe, es importante la proporción de la misma que el organismo pueda aprovechar para realizar una función biológica. Así, para determinar la calidad proteica hay que tener en cuenta la biodisponibilidad, que refleja de forma global los diferentes procesos metabólicos implicados en la utilización de la proteína por el organismo, considerando todos los factores que influyen en la misma (Hernández et al., 1996).

La calidad de las proteínas puede evaluarse *in vivo*, principalmente en ratas (por digerir las proteínas de forma similar al hombre), o *in vitro*,

y los métodos se clasifican en función de que permitan evaluar esta calidad a través de la composición en aminoácidos de la proteína (índices químicos), determinando su digestibilidad o bien su biodisponibilidad (Hernández et al., 1996).

### 2.2.1. Determinación de los índices químicos

Muchos estudios han confirmado que la calidad de las proteínas depende de su contenido en aminoácidos esenciales. Una vez determinados los aminoácidos de la muestra, se comparan con proteínas de referencia para predecir la calidad.

El *índice químico* (*chemical score*) se calcula como porcentaje del valor de cada aminoácido esencial de la proteína problema respecto del contenido del mismo aminoácido en la proteína tomada como referencia. Al aminoácido esencial presente en menor proporción se le denomina *limitante* y a la cifra obtenida se le denomina *índice químico*.

$$\text{Índice químico} = \frac{\text{mg del aminoácido limitante en 1g de proteína problema}}{\text{mg del mismo aminoácido en la proteína de referencia}} \cdot 100$$

En principio, se propuso utilizar la proteína del huevo como referencia por tener un valor biológico de casi 100, pero después se introdujeron otras proteínas para obtener una mejor concordancia entre las predicciones químicas y biológicas (Navas et al., 2005).

Actualmente, se considera más apropiado utilizar proteínas patrón de referencia (*amino acid scoring pattern*), que reflejan los

requerimientos de aminoácidos esenciales para los distintos grupos de edad y, en el caso de los lactantes, se basan en la composición de la leche humana. El índice químico se denomina *índice de aminoácidos (amino acid score)*. La FAO/OMS (1985) y FNB (2005) han publicado proteínas patrón que pueden utilizarse como referencia en el cálculo. En el cuadro 6 se indican estas proteínas patrón para lactantes y niños de corta edad.

Los aminoácidos limitantes en la dieta humana suelen ser la lisina, los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), la treonina y el triptófano (FAO/OMS, 1985, Navas et al., 2005).

La ventaja de estos métodos es la sencillez, la identificación del aminoácido limitante y su utilidad para el diseño de mezclas de proteínas complementarias con gran valor nutritivo. El principal inconveniente es que no tienen en cuenta la digestibilidad ni la biodisponibilidad de los aminoácidos (Navas et al., 2005).

Cuadro 6. Composición de aminoácidos (mg/g proteína) de las proteínas patrón de referencia propuestas por la FAO/OMS (1985) y el FNB (2005) para lactantes y niños de corta edad.

	Edad (años)	His	Ile	Leu	Lys	Met +Cys	Phe +Tyr	Thr	Trp	Val
FAO/OMS	0-1	26	46	93	66	42	72	43	17	55
	2-5	19	28	66	58	25	63	34	11	35
FNB	0-1	23	57	101	69	38	87	47	18	56
	1-3	18	25	55	51	25	47	27	8	32

### 2.2.2. Determinación de la digestibilidad de las proteínas

La determinación de la digestibilidad proteica puede realizarse *in vivo* a través de los contenidos de nitrógeno en el alimento y en las heces. La digestibilidad proteica aparente y la verdadera se calculan usando las expresiones siguientes:

$$\text{Digestibilidad proteica aparente} = \frac{I - F}{I} \cdot 100$$

$$\text{Digestibilidad proteica verdadera} = \frac{I - (F - F_k)}{I} \cdot 100$$

donde: I = nitrógeno ingerido, F = nitrógeno fecal procedente de la dieta (no absorbido) y  $F_k$  = nitrógeno fecal no procedente de la dieta (endógeno o metabólico).

La digestibilidad proteica aparente no es exacta porque no considera el nitrógeno fecal endógeno ( $F_k$ ), que incluye nitrógeno de bacterias intestinales, de descamaciones de células de la mucosa intestinal, enzimas metabólicos, etc. Para determinar el  $F_k$ , se administra una dieta que no incluya proteínas. Si la dieta sólo contiene una pequeña cantidad de fibra no es necesario determinar el valor de  $F_k$ , pues se acepta un valor de 12 mg de nitrógeno/kg por día. Ingestas elevadas de fibra dietética, especialmente hemicelulosa y salvado de cereales, aumentan la excreción de nitrógeno en las heces, reduciendo alrededor de un 10% la digestibilidad proteica aparente. Por lo tanto, en la determinación de la

digestibilidad proteica debe tenerse en cuenta la composición de la dieta en su totalidad (FAO/OMS, 1985; FNB, 2005).

La determinación de la digestibilidad proteica *in vitro* se basa en digerir la muestra con enzimas proteolíticos en condiciones estandarizadas. Existen métodos monoenzimáticos, en los que se utiliza únicamente pepsina, tripsina o pronasa, y se mide el nitrógeno solubilizado; y multienzimáticos, en los que se digiere la muestra con distintos enzimas y después se determina el nitrógeno, siendo ensayos laboriosos (Hernández et al., 1996).

Se dispone de métodos multienzimáticos rápidos basados en la medida del pH. Uno de estos métodos consiste en estimar la digestibilidad mediante la medida de la caída de pH, que se produce tras una incubación con tripsina, quimotripsina y peptidasa intestinal a 37°C durante 10 minutos y/ o después de una incubación con proteasa microbiana a 55°C también durante 10 minutos (AOAC, 2002). Se ha propuesto otro método que se basa en la digestión de la proteína con tripsina, quimotripsina y peptidasa a 37°C durante 10 minutos, y la determinación de la cantidad de NaOH necesaria para mantener el valor del pH en 8. Dicha cantidad es directamente proporcional al número de uniones peptídicas hidrolizadas (Rozan et al., 1997).

### 2.2.3. Determinación de la biodisponibilidad de las proteínas

La determinación de la biodisponibilidad se puede realizar por métodos directos, principalmente *in vivo*, o por métodos indirectos,

correlacionando los resultados del análisis de aminoácidos y de la digestibilidad (Hernández et al., 1996).

### *Métodos directos*

Muchos aminoácidos experimentan modificaciones en su estructura, como consecuencia del calentamiento o almacenamiento del alimento, que impiden su utilización metabólica. A estas formas se les denomina “no disponibles” y su determinación por métodos químicos se ha propuesto como indicador de la calidad proteica. La lisina y los aminoácidos azufrados son los más afectados (Navas et al., 2005).

La biodisponibilidad de las proteínas alimentarias también puede evaluarse mediante bioensayos, que habitualmente se realizan en ratas, y se basan en la ganancia de peso o la medida del nitrógeno retenido en función de la proteína ingerida. Así, se han determinado parámetros como el *coeficiente de eficacia proteica (PER o protein efficiency ratio)*, el *coeficiente proteico neto (NPR o net protein ratio)* y la *utilización neta proteica (NPU o net protein utilization)*.

El *PER* y *NPR* se basan en la determinación de la ganancia de peso. El método *PER* se realiza con ratas macho, en período de destete, de 21 a 28 días de edad, enjauladas individualmente. Se requiere un período de adaptación de 3 a 7 días y 28 días de ensayo. Se suministra agua y una dieta con el 10% de proteínas. Se mide regularmente el consumo y peso del animal y se establece el *PER* como el cociente entre la ganancia de peso y la proteína consumida. El método *NPR* se realiza del mismo modo, pero en 10 días, y además, se incluye un grupo de ratas alimentadas con

una dieta sin proteínas. La pérdida de peso en este grupo se adiciona a la ganancia de peso obtenida en el grupo que ingiere proteína (Hernández et al., 1996; Rozan et al., 1997).

La *NPU* determina la proporción del nitrógeno ingerido que retiene el organismo en unas condiciones determinadas. Se puede estimar mediante la determinación de la digestibilidad proteica verdadera y el valor biológico (VB), y después calculando el producto de ambos. El VB es la proporción de nitrógeno absorbido que es retenido por el organismo y, para su determinación se utilizan ratas macho, en período de destete, enjauladas individualmente, con agua y una dieta que contiene un 8-10% de proteínas. Otro grupo de animales se alimenta con una dieta sin proteínas para calcular las pérdidas endógenas. Se recolectan las heces y orina, al menos cada dos días, para la determinación del nitrógeno (Hernández et al., 1996).

#### *Métodos indirectos*

Puesto que el valor de las proteínas puede diferir dependiendo de su composición en aminoácidos esenciales y su digestibilidad, se ha adoptado como método adecuado para la medida de la calidad proteica en nutrición humana el *método de graduación o índice químico corregido por la digestibilidad (PDCASS o protein digestibility corrected amino acid score)*. Este indicador se calcula con la siguiente expresión:

$$\text{PDCAAS (\%)} = \frac{\text{mg de aminoácido limitante en 1g de proteína problema} \times \text{Digestibilidad proteica verdadera (\%)}}{\text{mg del mismo aminoácido en la proteína de referencia}}$$

Los valores de proteínas que excedan del 100% se ajustan al 100% (Navas et al., 2005; FNB, 2005).

Otro método indirecto para determinar la biodisponibilidad proteica es el *coeficiente de eficacia proteica calculado (C-PER)*, que se obtiene a partir de la composición en aminoácidos esenciales de la muestra proteica y de la digestibilidad enzimática. La digestibilidad enzimática se determina sometiendo la muestra a una digestión *in vitro* con enzimas proteolíticas (tripsina, peptidasa, quimotripsina y proteasa). Un inconveniente del método C-PER es que en el alimento pueden existir determinados antinutrientes inhibidores de las proteasas y por este método las proteínas pueden presentar una digestibilidad inferior a la real.

### 3. REACCIÓN DE MAILLARD

De las numerosas reacciones que pueden tener lugar durante el procesado de los alimentos, la RM es una de las que afecta a mayor número de ellos. Esta reacción se desarrolla también durante el almacenamiento y los compuestos que origina se han utilizado como indicadores químicos de calidad (Sanz et al., 2003).

La RM es la principal reacción de pardeamiento no enzimático y comienza con la condensación del grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína con un grupo carbonilo, que procede, normalmente, de un azúcar reductor, aunque también puede proceder de la degradación del ácido ascórbico o de productos formados durante la oxidación lipídica (Chuyen, 1998).

En la mayoría de alimentos, el grupo amino de los residuos de lisina es la fuente primaria de grupos amino reactivos. El grupo imidazol de la histidina, el grupo indol del triptófano y el grupo guanidino de los residuos de arginina también pueden reaccionar, pero en menor medida (Oliver et al., 2006). Los azúcares que fundamentalmente reaccionan con los aminoácidos son los monosacáridos glucosa y fructosa y los disacáridos maltosa y lactosa. Las pentosas con carácter reductor también pueden participar en la RM en algunos alimentos, como en la carne (del Castillo, 1999; Zamora y Hidalgo, 2005).

En leche y productos de base láctea los grupos amino proceden, principalmente, de los residuos de lisina de las proteínas lácteas. Parece ser que la actividad de los residuos de lisina de la caseína es mayor que la de las seroproteínas, siendo la k-caseína la más reactiva. El azúcar reductor es la lactosa, disacárido de glucosa y galactosa (Cheftel y Cheftel, 1999).

La RM origina una gran variedad de compuestos responsables de cambios en el color y el aroma de los alimentos, por lo que forma parte de manera controlada de diferentes procesos de tecnología de alimentos, como el tostado del café y de los cereales, la fabricación del chocolate y el horneado del pan, y se produce a menudo al aplicar técnicas culinarias, por ejemplo en el asado de la carne, para producir colores, aromas y sabores deseados. Por ello, los productos de la RM son componentes usuales en la dieta (O'Brien y Morrissey, 1989; Martins et al., 2001).

### **3.1. Química de la RM** (O'Brien y Morrissey, 1989; Van Boekel, 1998; Cheftel y Cheftel, 1999; Martins et al., 2001)

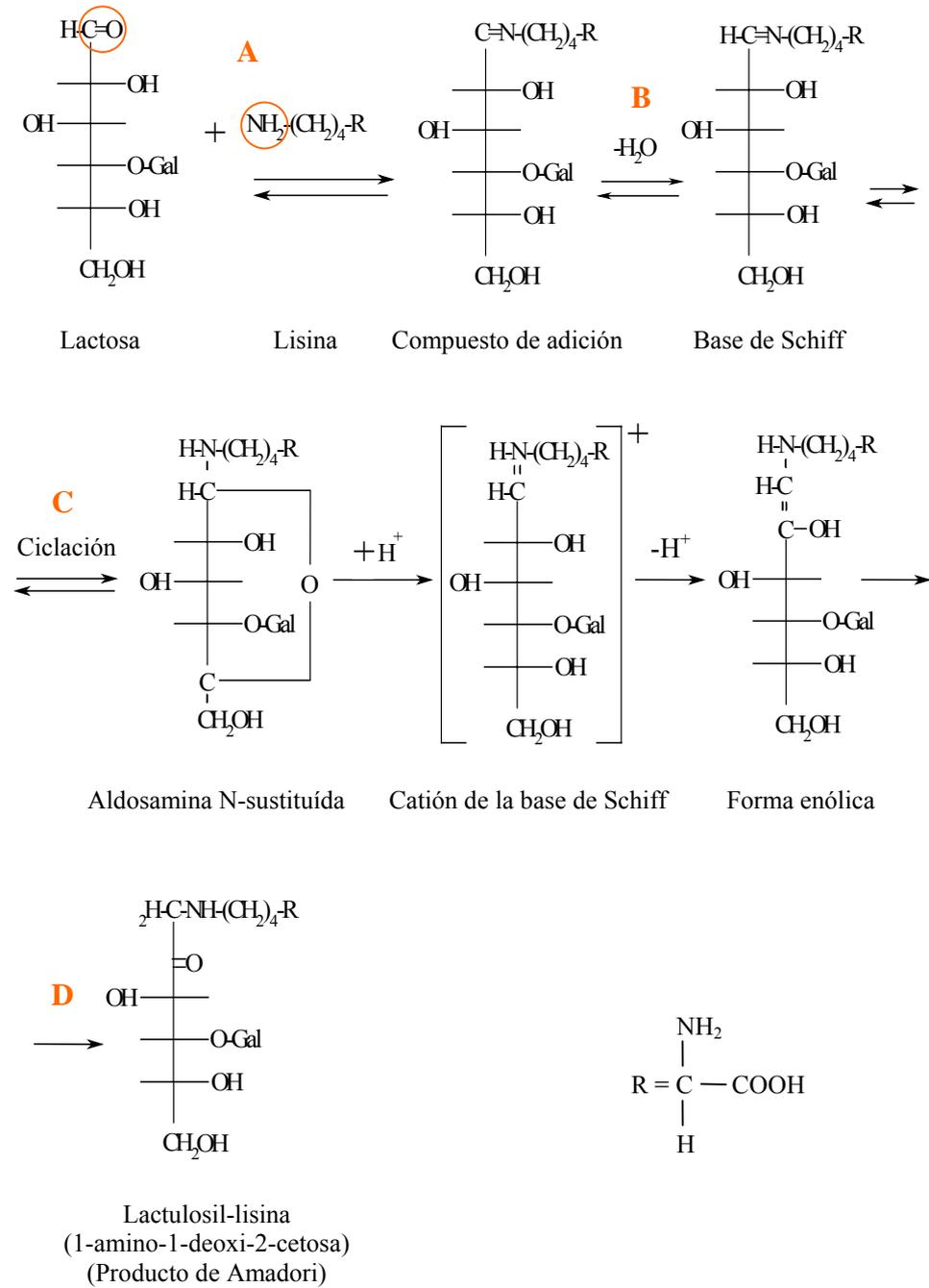
La RM fue descrita por vez primera por el químico francés Louis-Camille Maillard en 1912, al observar la formación de pigmentos pardos cuando reaccionaban azúcares reductores y aminoácidos; pero el primer esquema coherente de la RM fue propuesto por Hodge en 1953. En la RM, pueden diferenciarse tres etapas: inicial, avanzada y final.

En la *etapa inicial* (en la figura 2 se muestra un esquema de esta etapa en la leche), se produce una reacción de condensación entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor y el grupo amino libre de un

aminoácido, péptido o proteína (figura 2 A). El compuesto formado pierde una molécula de agua y da lugar a una base de Schiff (figura 2 B), que a continuación se transforma por ciclación en la correspondiente glicosilamina N-sustituida (figura 2 C). Al reordenamiento de una aldósilamina-N-sustituida para formar una 1-amino-1-deoxi-2-cetosa se le da el nombre de reordenamiento de Amadori y es el que suele ocurrir en los alimentos (figura 2 D). Al reordenamiento de una cetósilamina-N-sustituida para formar una 2-amino-2-deoxialdosa se le conoce como reordenamiento de Heyns. Los mencionados reordenamientos que resultan en la formación de una deoxicetosa o deoxialdosa (según sea el azúcar reactivo una aldosa o cetosa, respectivamente) constituyen el primer paso irreversible de la RM.

Los compuestos de Amadori formados por la reacción entre los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina con la glucosa, la lactosa o la maltosa reciben el nombre de fructosil-lisina, lactulosil-lisina y maltulosil-lisina, respectivamente. En estos compuestos, la lisina ya no es disponible, por lo que en esta etapa se reduce el valor nutritivo del alimento. En el caso de la leche, se forma lactulosil-lisina (figura 2 D) como producto de Amadori (Krause et al., 2003; Meade et al., 2005).

Figura 2. Etapa inicial de la RM en la leche.



En las *etapas avanzadas*, se produce la degradación de los compuestos de Amadori que, dependiendo del pH, puede ocurrir por dos vías principales. A pH inferior a 7, la enolización que afecta a los carbonos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> favorece la formación de 1,2-eneaminol (vía 1,2-E, figura 3); mientras que a pH alcalino, la enolización que afecta a los carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> da lugar a la formación de 2,3-enediol (vía 2,3-E, figura 4). Además, el compuesto 1-amino-1-deoxi-2-cetosa, que es una amina secundaria, podría reaccionar con otra molécula de azúcar en una segunda RM para formar una dioxiketosa-amina.

Existe controversia respecto a la vía mayoritaria a pH neutro. Martins et al. (2001) consideran que se produce la vía 1,2-E, mientras que Van Boekel (1998), indica que la vía 2,3-E es la principal.

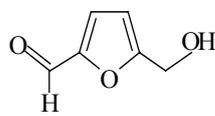
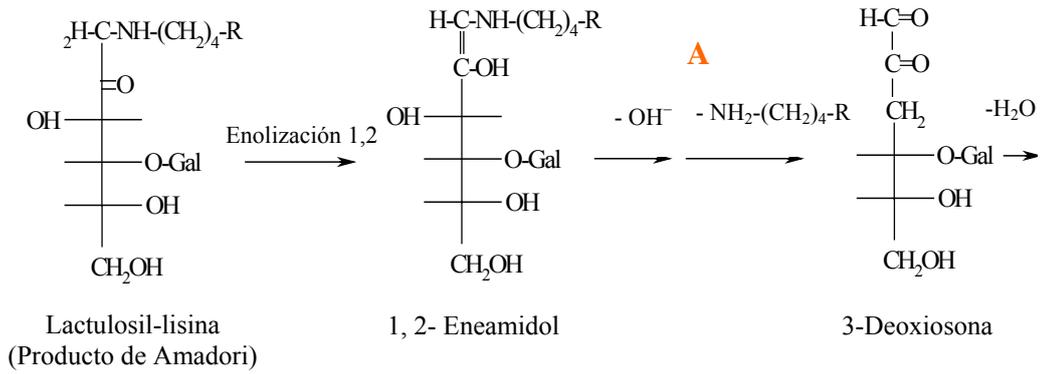
En la vía 1,2-E, el compuesto 1,2-eneaminol pierde el grupo hidroxilo del C<sub>3</sub> con la consiguiente desaminación del C<sub>1</sub> (figura 3 A). Se forma 3-deoxiosona que por deshidratación se convierte en un compuesto dicarbonilo insaturado (figura 3 B), a partir del cual, mediante ciclaciones, nuevas deshidrataciones y translocaciones de los dobles enlaces se originan diferentes compuestos como 5-hidroxi-2-furfural (HMF), 2-furfural, furfuralcohol, pirralinas, lisipirralinas, imidazolonas y pentosidina.

En la vía 2,3-E, el compuesto 2,3-enediol se desamida (figura 4 A) y forma un producto intermedio, 1-metil-2,3-dicarbonilo (1-deoxiosona), cuya rotura da lugar a una variedad de productos de fisión que incluyen reductonas, otros dicarbonilos y aldehídos.

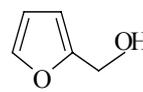
En presencia de proteínas o grupos amino, algunos de los productos formados pueden condensar por entrecruzamiento (*cross-links*) y formar agregados poliméricos. Estos compuestos reciben el nombre de productos de glicación de las etapas avanzadas de la RM o AGEs (*advanced glycation end products*) (Ferrer et al., 2000a).

En la leche, cuyo pH es 6.6, la degradación del producto de Amadori ocurre, principalmente, por la ruta 2,3-E (Van Boekel, 1998), y se originan compuestos como carboximetil-lisina (CML), ácido eritrónico, 3-furanona,  $\beta$ -piranona, ciclopentenonas, maltoles, galactosil-isomaltos, que a su vez pueden seguir reaccionando. En presencia de grupos amino, las  $\beta$ -piranonas, ciclopentenonas y galactosil-isomaltos condensan fácilmente con productos que contienen nitrógeno, como acetilpirroles, piridinium betaínas, maltosinas y furanona-amina, algunos de los cuales pueden reaccionar con proteínas para formar compuestos por uniones de entrecruzamiento. Además de estos compuestos, en leche y en sistemas similares se ha identificado, histidinoalanina (HAL), imidazol-lisina, pentodil-lisina y pirrolopiridinas. En la figura 4 se indican las estructuras de estos compuestos.

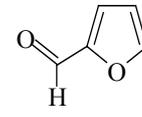
Figura 3. Vía 1,2-E de la RM en la leche.



HMF



Furfuralalcohol



2-Furfural

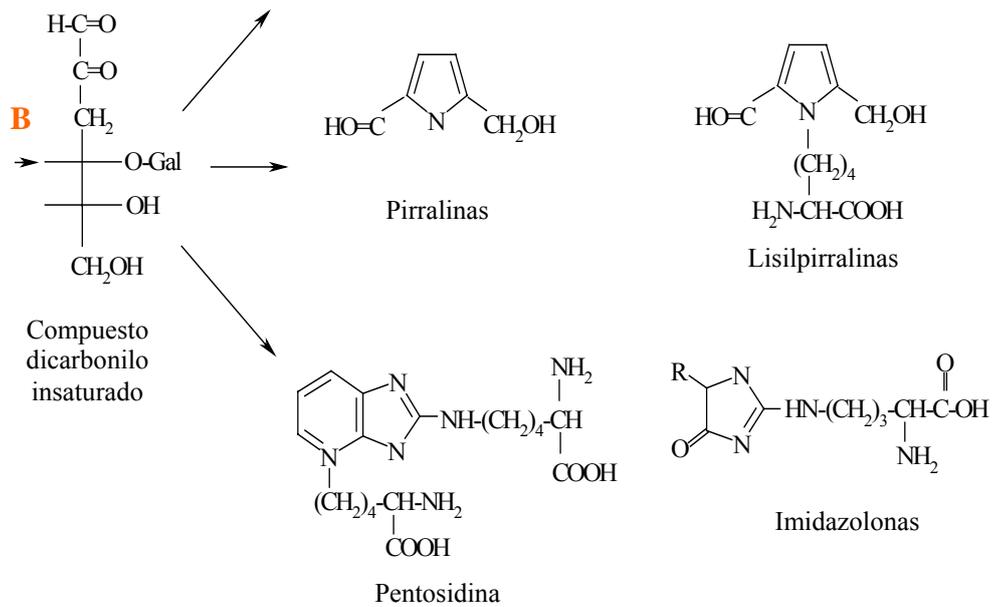


Figura 4. Vía 2,3-E de la RM en la leche.

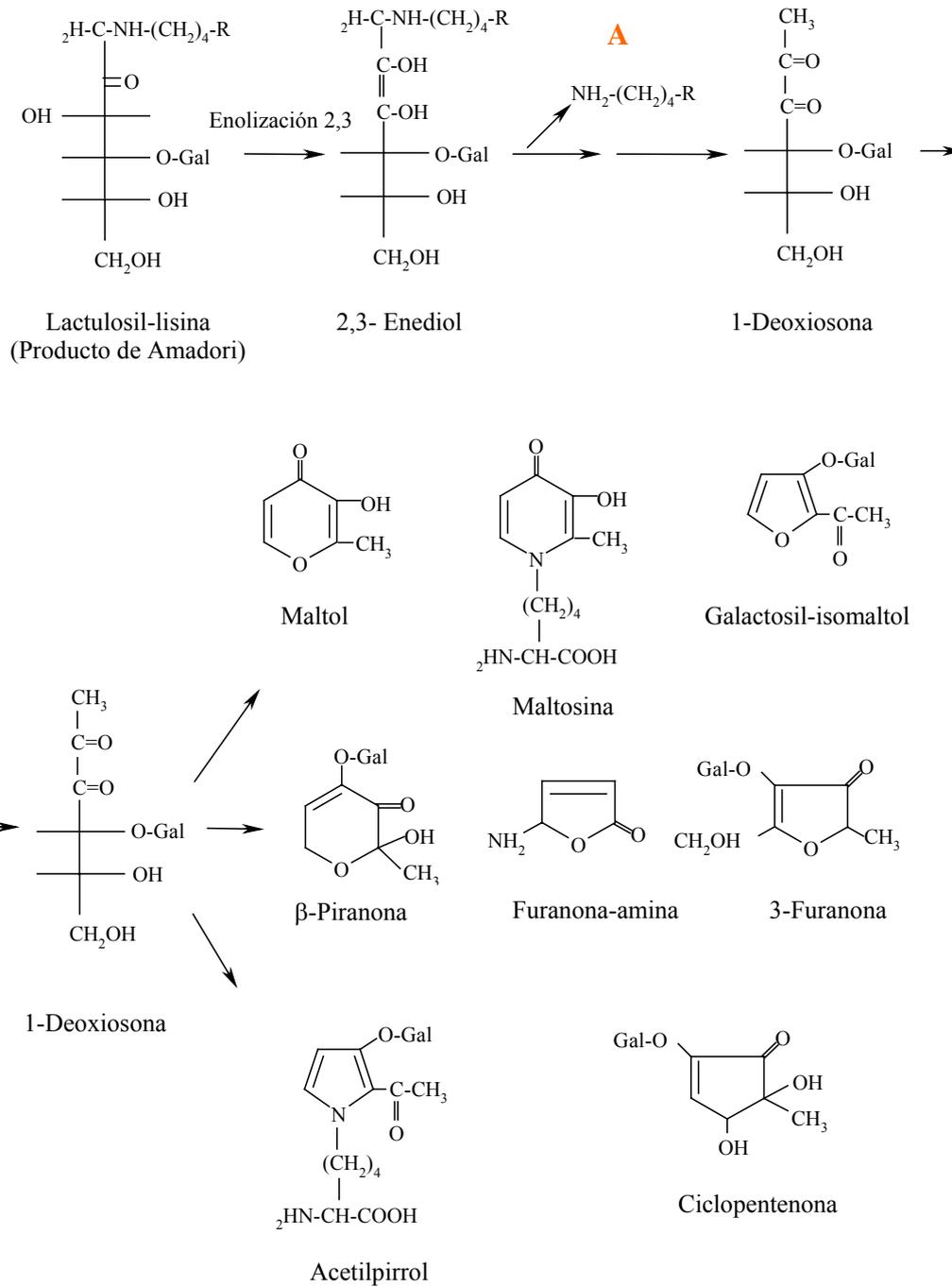
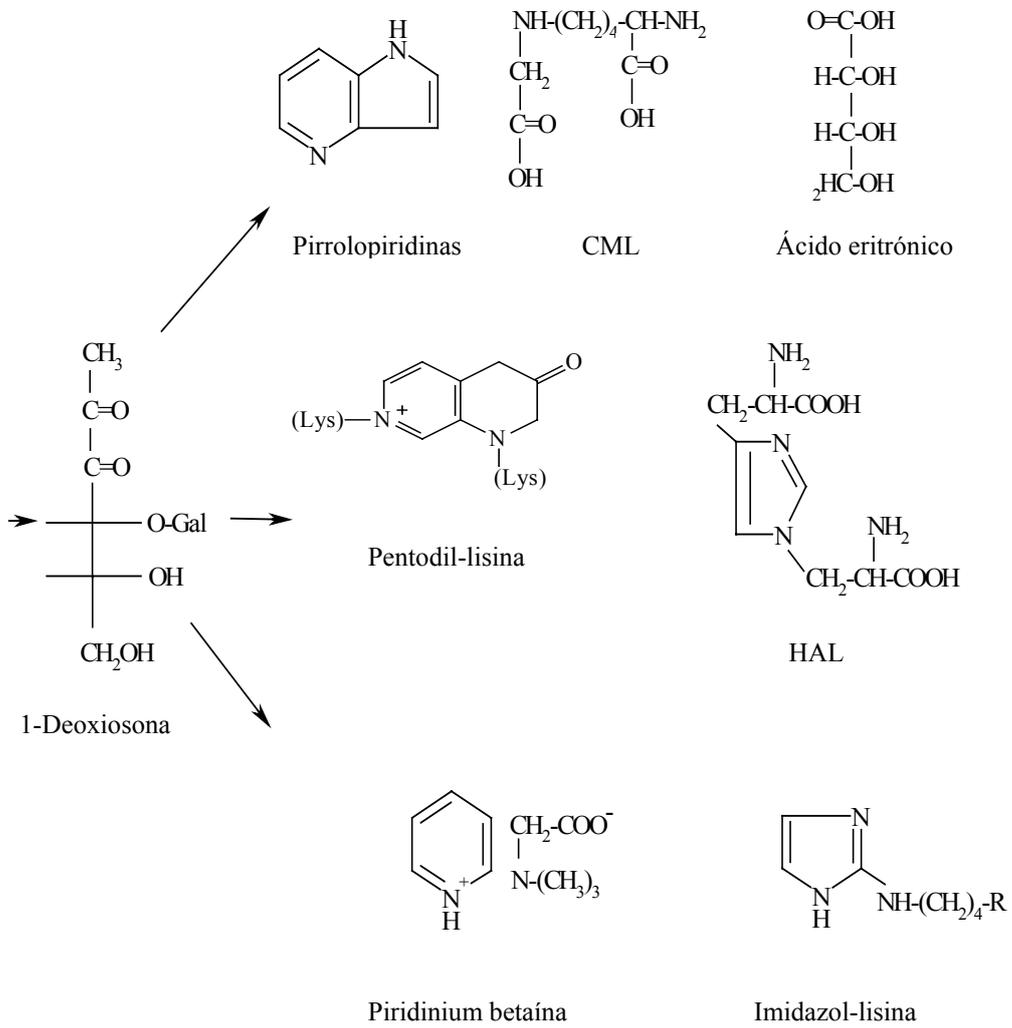


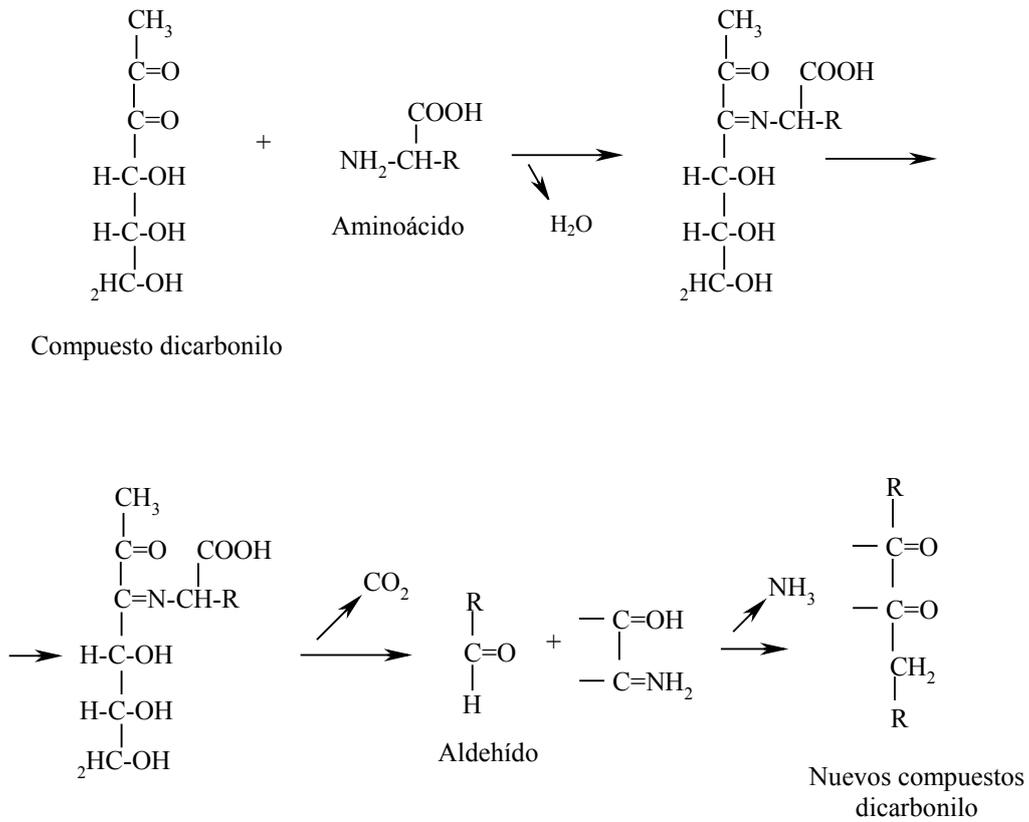
Figura 4. Vía 2,3-E de la RM en la leche (continuación).



Existe una tercera ruta de degradación del producto de Amadori que es importante para disacáridos en condiciones alcalinas, en la que se forma 4-deoxiaminoreductona y 5,6-dihidro-3-hidroxi piridona, productos que se degradan tras tratamientos térmicos prolongados. Esta ruta no se produce en la leche al no ser el pH adecuado.

Los compuestos dicarbonilo producidos en las vías anteriores, mediante la degradación de Strecker (indicada en la figura 5), pueden reaccionar con aminoácidos para dar aldehídos (con un átomo de carbono menos que el aminoácido original) y dióxido de carbono. Se forman, además, nuevos compuestos carbonilo que pueden reaccionar entre sí, con aldehídos o con grupos amino y producir compuestos volátiles aromáticos. La mayoría de compuestos dicarbonilo reactivos en la degradación de Strecker se producen en la vía 2,3, y algunos en la vía 1,2. Así, a valores de pH más altos se favorecería la degradación de Strecker y se incrementaría la producción de CO<sub>2</sub> y compuestos volátiles.

Figura 5. Degradación de Strecker.



Las *etapas finales* de la RM son complejas y poco conocidas, y conducen a la conversión de los precursores de bajo peso molecular, como furfurales, productos de fisión y reductonas, en melanoidinas, pigmentos pardos de elevado peso molecular que contienen nitrógeno, pero cuya estructura está poco definida (Ames, 2001). Las aminas podrían participar en estas reacciones. Se considera que las melanoidinas se originan por condensaciones de grupos aldol y por polimerizaciones entre grupos aldehído y amino. Las melanoidinas tienen un peso molecular variable y absorben en la región del visible.

En el caso de la leche, se ha comprobado que la mayor parte de los pigmentos pardos que se forman están unidos a proteínas, aunque la naturaleza de las uniones no es bien conocida. Es de esperar que los residuos de lisina participen en la formación de melanoidinas, puesto que la lisina también disminuye durante las etapas finales de la RM.

Aunque las melanoidinas son los últimos compuestos que se forman en la RM, muchos de los productos de bajo peso molecular formados en la misma son también muy importantes en la producción de flavor.

Los azúcares sencillos, azúcares ácidos y otros compuestos polihidroxicarbonados dan reacciones de pardeamiento a altas temperaturas en ausencia de grupos amino libres, originando productos similares a los resultantes de la RM. Esta reacción se llama caramelización y se ve favorecida a temperaturas superiores a 120°C, valores de pH inferiores a 3 o superiores a 9 y contenidos muy bajos de

humedad (Olano y Martínez-Castro, 1996; Cardelle-Cobas y Villamiel, 2005).

### **3.2. Factores que afectan al desarrollo de la RM (O'Brien y Morrisey, 1989; Cheftel y Cheftel, 1999)**

#### 3.2.1. Naturaleza y concentración de los compuestos que reaccionan

Los compuestos de bajo peso molecular suelen ser más reactivos que los de elevado peso molecular, debido al mayor impedimento estérico en estos últimos. Así, generalmente, las aldopentosas son más reactivas que las aldohexosas y los monosacáridos más que los disacáridos u oligosacáridos. Según eso, la glucosa es más reactiva que la lactosa y la hidrólisis de ésta en la leche en polvo aumenta el porcentaje de pardeamiento.

Las aldosas suelen ser más reactivas que las cetosas, probablemente, a consecuencia del mayor impedimento estérico del grupo carbonilo de las cetosas.

La sacarosa, que carece de función reductora libre, no afecta al pardeamiento, salvo en alimentos muy ácidos o durante tratamientos severos (por ejemplo, en disolución acuosa neutra a temperaturas superiores a los 130 °C), donde se hidroliza de forma progresiva a glucosa y fructosa, que pueden participar en la RM.

La naturaleza del compuesto amino también influye en el desarrollo de la RM. Por ejemplo, la lisina es más reactiva que otros

aminoácidos por tener en la cadena lateral un grupo amino libre. Así, las proteínas de la leche, ricas en lisina, tienden a dar más pardeamiento que las proteínas pobres en lisina.

### 3.2.2. Actividad de agua y estado físico-químico del alimento

La RM aumenta de forma exponencial con el contenido de humedad hasta alcanzar un máximo, por incremento de la movilidad de los compuestos reaccionantes. La reacción disminuye a contenidos de humedad muy altos por el efecto diluyente de la fase acuosa y por acción de la ley de masas, pues en la reacción se produce agua. La velocidad de pardeamiento pasa por un máximo en actividades de agua ( $A_w$ ) comprendidas entre 0.55 y 0.75.

Así, los alimentos deshidratados son los más estables, siempre que se mantengan en envases impermeables y a una temperatura moderada.

El estado físico-químico del alimento también afecta al desarrollo de la RM. La isoterma de absorción de agua depende de si el sistema es cristalino o amorfo y de otros factores, como la composición grasa.

### 3.2.3. pH

Las distintas reacciones que integran la RM tienen su pH óptimo; si bien, en general, condiciones ligeramente alcalinas favorecen la evolución de la reacción.

La RM es menos intensa a valores de pH ácidos y aumenta con el incremento del pH hasta aproximadamente 10. A pH superior a 10,

disminuye la reacción, lo que puede deberse a una deficiencia de protones, necesarios para catalizar los reordenamientos de Amadori y de Heyns.

Debe tenerse en cuenta que el pH del sistema disminuye durante la reacción al desaparecer grupos amino básicos. Las melanoidinas, productos finales de la RM, son de estructura desconocida, pero se sabe que presentan una naturaleza ácida, pues a medida que la reacción avanza los residuos de aminoácidos, como lisina, arginina y triptófano, se pierden (Hiramoto et al., 2004).

#### 3.2.4. Temperatura

Las energías de activación de ciertas etapas del pardeamiento no enzimático son relativamente elevadas y, además, la velocidad de desaparición de nitrógeno amínico se multiplica por 20.000 cuando la temperatura aumenta de 0 a 70°C. Por lo tanto, a temperaturas bajas el pardeamiento puede retardarse y por el contrario a temperaturas elevadas aumenta fuertemente.

Los primeros estudios que han permitido conocer la influencia de las distintas condiciones de temperatura y tiempo de calentamiento sobre la RM se han realizado en sistemas modelo. De ellos se deduce que la disminución de la lisina disponible y el aumento de compuestos de las etapas avanzadas son mayores con el incremento de la temperatura y del tiempo.

Distintos autores han evaluado la influencia de tratamientos térmicos utilizados en leche de vaca (pasteurización, esterilización, UHT) y los resultados obtenidos muestran que el desarrollo de la RM es más intenso en la leche esterilizada que en la UHT y más en ésta que en la pasteurizada (Ferrer, 2001).

#### 3.2.5. Otros factores

Las sales de cobre y de hierro parecen acelerar la RM, mientras que el estaño y el manganeso parecen inhibirla. El cobalto también parece acelerar la reacción, pero sólo en medio ácido. Algunos de los efectos de las sales metálicas pueden deberse a cambios en el pH.

Los fosfatos favorecen la RM y el desarrollo de cromóforos.

Componentes como el malonato de etilo, la fenilacetona, las sales de aminas terciarias, el ácido acético y el trifluoruro de boro catalizan la RM y el reordenamiento de Amadori.

Aditivos como el dióxido de azufre y los sulfitos inhiben las reacciones de pardeamiento no enzimático.

### **3.3. Consecuencias de la RM**

Como consecuencia de la RM disminuye el valor nutritivo, al reducirse la digestibilidad de las proteínas y degradarse aminoácidos esenciales, como la lisina, principalmente; se forman compuestos potencialmente tóxicos y mutagénicos y también compuestos con

actividad antioxidante (Olano y Martínez-Castro, 1996; Martins et al., 2001).

### 3.3.1. Efectos sobre el valor nutritivo

#### *Destrucción y pérdida de aminoácidos esenciales*

La RM puede reducir el valor nutritivo de los alimentos por destrucción de aminoácidos esenciales. A diferencia de las bases de Schiff formadas en las primeras etapas de la RM, que desde un punto de vista nutricional parecen ser equivalentes a los aminoácidos libres, se considera que los compuestos de Amadori, a pesar de ser fuentes de nitrógeno, no tienen valor nutritivo. También se dispone de algunas pruebas de la regeneración *in vivo* de pequeñas cantidades de aminoácidos (menos de un 0.5%) a partir de compuestos de Amadori, posiblemente por la acción de la microflora intestinal, pero se desconoce si estos aminoácidos regenerados son biodisponibles (O'Brien y Morrissey, 1989).

En la mayoría de alimentos, la disminución de la disponibilidad de lisina es la consecuencia más significativa de la RM. Este hecho adquiere importancia nutricional cuando el alimento se utiliza como complemento de una dieta donde la lisina es limitante (por ejemplo, basada en cereales) y si está destinado a un grupo de población con altas necesidades nutricionales (Meade et al., 2005).

La importancia de las pérdidas de aminoácidos azufrados, arginina, triptófano e histidina, depende de la intensidad del tratamiento

térmico aplicado al alimento (O'Brien y Morrisey, 1989; Meade et al., 2005).

#### *Destrucción de ácido ascórbico*

El ácido dehidroascórbico reacciona, vía RM, con componentes amino de los alimentos, formando pigmentos rojos y pardos. Sin embargo, la mayor parte del ácido ascórbico se destruye en la mayoría de procesos de elaboración y condiciones de almacenamiento, y prácticamente ha desaparecido cuando la RM comienza a ser significativa (O'Brien y Morrisey, 1989).

#### *Disminución de la digestibilidad proteica*

El desarrollo de enlaces cruzados (*cross-links*) puede reducir la digestibilidad de las proteínas. Además, ciertos productos de la RM (PRM) podrían inhibir la actividad de los enzimas digestivos. Así, se ha comprobado que las premelanoidinas (productos de Maillard de bajo peso molecular solubles en agua) inhiben determinados enzimas proteolíticos, como, por ejemplo, la tripsina (O'Brien y Morrisey, 1989; Martins et al., 2001), y el HMF inhibe la carboxipeptidasa A (Seiquer et al., 2006).

En adolescentes que consumen dietas ricas en PRM, se ha observado una disminución de la digestibilidad proteica respecto a aquellos que consumen menor cantidad de alimentos con PRM. Los alimentos incluidos en ambas dietas son básicamente los mismos, pero el procesado es diferente, por ejemplo, en el caso de dietas ricas en PRM se incluyen alimentos fritos, tostados y asados, en lugar de hervidos, cuando

es posible. Además, se incluyen alimentos que contienen PRM desarrollados durante la fabricación, como cereales de desayuno, productos de panadería, chocolate y café (Seiquer et al., 2006).

#### *Interacciones de los PRM con minerales*

Los PRM interactúan con determinados iones metálicos, pero la naturaleza de estas interacciones es poco conocida. A este respecto se han estudiado distintos minerales, como cinc, cobre, hierro, calcio, magnesio, fósforo y sodio. Dichas interacciones pueden afectar de forma negativa al metabolismo de determinados minerales en seres humanos. Así, se ha señalado un aumento en la excreción urinaria de cinc, cobre y hierro en seres humanos alimentados vía intravenosa con disoluciones de aminoácidos o hidrolizados proteicos tratados en autoclave en presencia de glucosa. En cambio el incremento no se observa, cuando dichas disoluciones se esterilizan por separado. La excreción urinaria de magnesio no se ve afectada (O'Brien y Morrissey, 1989).

La administración de PRM por medio de la ingesta de copos de maíz tostados provoca una reducción de la retención de cinc a largo plazo (O'Brien y Morrissey, 1989).

La unión de cinc y cobre a los PRM se ha estimado *in vitro* en copos de maíz sometidos o no a tratamiento térmico. La retención de cinc y de cobre es, respectivamente, 1.76 y 1.55 veces mayor en los sometidos a tratamiento térmico. También se ha demostrado *in vitro* la capacidad de los PRM procedentes del tostado del café para formar complejos con cobre y hierro (O'Brien y Morrissey, 1989).

En estudios realizados en ratas alimentadas con PRM, se ha observado un aumento en la excreción urinaria de cinc, calcio, magnesio, sodio y fósforo (O'Brien y Morrissey, 1989). Además, en ratas alimentadas con PRM derivados de mezclas calentadas de glucosa y lisina o glucosa y metionina, se ha detectado una disminución en la retención ósea de calcio, lo que podría desembocar en el desarrollo de enfermedades degenerativas como la osteoporosis (Delgado-Andrade et al., 2006). En cambio, se ha observado un incremento en la retención total de hierro (aunque la hemoglobina disminuye), acumulándose en órganos, como el bazo, el riñón y el intestino delgado (Delgado-Andrade et al., 2004), y una mayor absorción y retención de cobre (Delgado-Andrade et al., 2002).

### 3.3.2. Aspectos toxicológicos

#### *Efecto mutagénico/antimutagénico*

Algunos PRM muestran actividad mutagénica. Los compuestos mutagénicos identificados incluyen desde sencillos compuestos dicarbonilo y compuestos heterocíclicos volátiles, como furanos, pirroles, ditanos, tiazoles, tiazolidinas, imidazoles y pirazinas, hasta aminas aromáticas heterocíclicas. Éstas son los mutágenos más potentes conocidos y constituyen un factor de riesgo en la etiología del cáncer humano.

Los compuestos derivados de la RM en la que participan azúcares tipo cetosa muestran mayor actividad mutagénica que los derivados de las correspondientes aldosas (Martins et al., 2001).

La formación de mutágenos se ha detectado en sistemas modelo y en distintos alimentos que han sufrido pardeamiento. En el café se han identificado compuestos dicarbonilo, metilglioxal, diacetil y glioxal, de los que el metilglioxal presenta la mayor actividad mutagénica; pero no se ha encontrado una correlación cuantitativa con las propiedades carcinogénicas. Otros alimentos en los que se han detectado compuestos mutagénicos de la RM son los cereales tostados, la salsa de soja, el pan, el bizcocho, las tortitas y las patatas fritas. En carne y pescado fritos y asados a la parrilla, se han identificado, principalmente, derivados de aminas heterocíclicas, cuya formación en el caso de la carne pudiera deberse a la presencia de creatina (importante precursor de las aminas heterocíclicas). Las temperaturas que se recomiendan para destruir los posibles patógenos en la carne podrían ser la causa de la formación de aminas heterocíclicas en cantidades importantes (O'Brien y Morrissey, 1989; Friedman, 1996; Martins et al., 2001; Lee y Shibamoto, 2002; Ponquett, 2002).

La formación de aminas heterocíclicas durante el calentamiento de la leche no es importante, porque las temperaturas aplicadas en los procesos tecnológicos no son suficientes para su formación y porque la leche no contiene creatina ni creatinina en cantidades significativas (Van Boekel, 1998).

Por otra parte, se ha observado que las melanoidinas formadas en la RM inhiben la actividad mutagénica de las aminas aromáticas heterocíclicas. Se han descrito interacciones entre ambas, de manera que podrían unirse, resistiendo la digestión y absorción en el intestino, y

excretarse intactas sin ejercer efecto dañino alguno. La naturaleza de las uniones es todavía desconocida (Somoza, 2005).

En la RM, también se forman compuestos capaces de inactivar mutágenos por modificaciones químicas o enzimáticas, así como compuestos que suprimen la mutagénesis una vez que el ADN ha sido modificado por el mutágeno (Friedman, 1996; Martins et al., 2001). Se ha observado asimismo que las melanoidinas degradan los nitritos e inhiben la formación de nitrosaminas carcinógenas (Chuyen, 1998).

### *Alergenicidad*

La alergenidad de los productos de la RM no está clara. En individuos hipersensibles a la leche de vaca, la actividad alérgica de la  $\beta$ -lactoglobulina aumenta por lactosilación ( $\beta$ -lactoglobulina-lactosa) (O'Brien y Morrisey, 1989). Según Friedman (1996), el tratamiento térmico podría reducir la antigenidad de la leche de vaca para las personas alérgicas a la misma, porque los sitios antigénicos de las proteínas responsables de las respuestas alérgicas podrían modificarse por reacción con azúcares reductores.

### *Efecto sobre los microorganismos del tracto gastrointestinal*

Los PRM tienen propiedades antibacterianas (Friedman, 1996; van Boekel, 1998). Las melanoidinas del café podrían unirse a *Streptococcus mutans* en la saliva protegiendo a la hidroxiapatita y ejerciendo un efecto anticariogénico (Somoza, 2005).

Los PRM pueden influir en el crecimiento de los microorganismos del tracto intestinal, lo que puede tener consecuencias tóxicas, ya que la microflora intestinal metaboliza muchos compuestos endógenos y extraños. Se ha observado la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Salmonella seftenberg*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Tetrahymena pyriformis* W, *Streptococcus lactis* y *Kluyveromyces fragilis*. *E.coli* y *K. fragilis* son microorganismos relativamente resistentes a la presencia de PRM, mientras que *P. fragi* y *P. fluorescens* son relativamente sensibles (O'Brien y Morrisey, 1989).

Los PRM estimulan el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus lactis*. En ratas alimentadas con PRM se ha demostrado un incremento del crecimiento de lactobacilos intestinales, con aumento de la concentración de ácido láctico y disminución del pH. No se observaron cambios en el recuento de enterococos, estafilococos, coliformes y clostridios (O'Brien y Morrisey, 1989).

En animales modelo y en seres humanos, las melanoidinas obtenidas a partir de la reacción entre caseína y lactosa o glucosa, lactoglobulina y glucosa y 7s-globulina de soja y glucosa inhiben la adhesión de la ureasa de la superficie de *Helicobacter pylori* a la mucina gástrica, suprimiendo la colonización. Sólo las estructuras de tamaño superior a  $2 \times 10^4$  Da tienen actividad inhibidora, por lo que se pierde en los productos de degradación de las melanoidinas. Éstas podrían constituir

una alternativa eficaz, segura y de fácil administración a la terapia a base de antibióticos (Hiramoto et al., 2004).

*Otros efectos toxicológicos de los PRM* (Friedman, 1996; O'Brien y Morrisey, 1989)

En ratas alimentadas con PRM se ha observado una disminución del crecimiento. No es fácil separar los efectos tóxicos de los meramente nutricionales, pero se ha demostrado que la disminución de peso no se explica totalmente por la destrucción de aminoácidos esenciales (como se comprueba adicionando a la dieta aminoácidos esenciales).

En distintos estudios en ratas se ha observado asimismo: ensanchamiento del ciego, lo que se atribuye a un cambio adaptativo en respuesta a los compuestos no digeribles que llegan al tracto gastrointestinal bajo; diarrea, que desaparece de forma gradual con la adaptación a la dieta, y se atribuye a un aumento de la osmolaridad por la presencia de material no absorbible; ligero aumento del tamaño de los riñones y nefrocalcinosis, por la capacidad de incrementar la concentración de calcio, fósforo y magnesio en orina y posible precipitación de fosfato cálcico; hepatotoxicidad; disminución de las concentraciones de glucosa en suero y de glucógeno en hígado, por una reducción de la absorción gastrointestinal de glucosa o de la hidrólisis intestinal de di- o polisacáridos; incremento relativo del peso del corazón, pulmón, bazo y estómago, este último debido posiblemente a una reducción en el vaciado gástrico; linfocitopenia e incremento de las restantes fracciones leucocitarias; disminución de las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol, por el aumento aparente de fibra

dietética que producen los PRM no digeribles, y aumento del hierro sérico total, lo que resulta sorprendente porque se ha descrito una disminución de la hemoglobina y del volumen celular.

### 3.3.3. Capacidad antioxidante/prooxidante de los PRM

El desarrollo de la RM se ha asociado a la formación de compuestos con gran capacidad antioxidante. El efecto antioxidante de los PRM fue descrito por primera vez por Franzke y Iwainsky en 1954, al observar la estabilidad a la oxidación de margarina adicionada de productos de la reacción entre glicina y glucosa. La capacidad antioxidante se atribuyó, principalmente a las melanoidinas. A partir de esta observación, dicha capacidad se ha estudiado *in vitro* e *in vivo* (Chuyen, 1998).

La actividad antioxidante de los PRM se ha observado en alimentos tratados térmicamente, como leche, carne, productos horneados y café. El café tostado posee mayor actividad antioxidante que el grano verde, pero algunos PRM con poder antioxidante probablemente se degraden si el tueste continúa (Ames, 2001).

Manzocco et al. (2001) estudian los cambios de color debidos a reacciones de pardeamiento no enzimático en sistemas modelo y alimentos (pasta y puré de tomate) y su relación con la formación de compuestos con capacidad antioxidante. Encuentran una correlación entre el color y las propiedades antioxidantes, que puede ser lineal positiva o no lineal, dependiendo de la composición, las propiedades fisico-químicas y el proceso tecnológico aplicado al producto.

Las propiedades antioxidantes de los PRM permiten proteger a los alimentos de la oxidación lipídica, que es el mecanismo primario por el que se deterioran en presencia de oxígeno. Además, podrían considerarse protectores frente al daño oxidativo asociado a una gran variedad de enfermedades como la diabetes y el cáncer, y en el envejecimiento (Martins et al., 2001; Lee y Shibamoto, 2002).

Los mecanismos de acción antioxidante de los PRM, incluyendo las melanoidinas, pueden ser: por captación de oxígeno libre, captación de oxígeno activo (radicales hidroxilo, superóxidos y peróxido), actuando como agentes reductores (dando hidrógeno o electrones) o por quelación de metales. Determinados metales, como el cobre, el hierro y el cinc, son capaces de catalizar ciertas reacciones oxidativas, por lo que los compuestos, como las melanoidinas, capaces de quelar estos metales, deben proteger frente a la oxidación (Ames, 2001).

Por otra parte, se ha visto que determinados PRM tienen capacidad prooxidante, es decir, son capaces de promover o aumentar las reacciones de oxidación. Las melanoidinas, cuya estructura todavía se desconoce, podrían actuar como antioxidantes o prooxidantes, según las condiciones de reacción y los materiales de partida que han reaccionado para su formación (Ames, 2001).

### **3.4. Indicadores de la RM durante el procesado y almacenamiento de los alimentos**

#### 3.4.1. Indicadores de las etapas iniciales de la RM

Los productos de Amadori formados en la primera etapa de la RM son responsables de la pérdida del valor nutritivo del alimento, ya que en estos compuestos la lisina no es disponible. Además, son precursores de numerosos compuestos que originan cambios sensoriales (color, aroma, flavor) en el alimento. Por ello, son indicadores muy sensibles para detectar cambios en la calidad causados por la RM (Olano y Martínez-Castro, 1996).

El producto de Amadori puede determinarse por análisis de los aminoácidos tras la hidrólisis enzimática de la proteína, pero este análisis es largo y tedioso y no resulta útil como método de control (Olano et al., 1992). Habitualmente, para conocer el desarrollo de las primeras etapas de la RM lo que se hace es estimar los contenidos de lisina disponible o no disponible.

La determinación de lisina disponible puede realizarse por métodos cromatográficos (Albalá-Hurtado et al., 1997a; Fernández-Artigas et al., 1999a); espectrofotométricos (Carpenter, 1960; Vigo et al., 1992); y fluorimétricos (Goodno et al., 1981; Morales et al., 1995; Ferrer et al., 2003a).

El indicador más específico de las etapas iniciales de la RM es la furosina ( $\epsilon$ -N-(furoilmetil)-L-lisina), que proporciona una estimación de

la lisina bloqueada y, por tanto, no disponible, y es un aminoácido artificial obtenido por hidrólisis ácida de los compuestos de Amadori lactulosil-lisina, fructosil-lisina o maltulosil-lisina (Corzo y Delgado, 1991). La furosina es fácil de determinar por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG), cromatografía de intercambio iónico o electroforesis capilar. En la actualidad, la CLAR es la técnica más utilizada para determinar furosina en productos lácteos (Ferrer et al., 1999).

El contenido de furosina varía dependiendo de la concentración del ácido utilizada en la hidrólisis. Así, por ejemplo, después de la hidrólisis con ácido clorhídrico 6M, un 32% de fructosil-lisina y un 34% de lactulosil-lisina y maltulosil-lisina se convierten en furosina; mientras que utilizando ácido clorhídrico 8M, estos porcentajes se transforman en 46, 50 y 51%, respectivamente (Krause, 2003). En el intervalo de concentraciones de HCl de 4 a 8 M se han obtenido regresiones lineales entre la formación de furosina y el contenido de HCl, con lo que es posible convertir los valores de furosina obtenidos utilizando distintas concentraciones de ácido (Henle et al., 1995).

El contenido de furosina se ha utilizado para estimar el porcentaje de lisina bloqueada en distintas muestras, como leche sometida a varios tratamientos térmicos (Bujard y Finot, 1978; Finot et al., 1981; Evangelisti et al., 1999a) y durante el almacenamiento (Hurrell et al., 1983), y en productos a base de leche y cereales (Erbersdobler y Hupe, 1991; Pizzoferrato et al., 1998; Evangelisti et al., 1999b). La fórmula

utilizada para determinar el porcentaje de lisina bloqueada a partir de la furosina, conociendo el valor inicial de lisina en la muestra, es:

$$\% \text{ bloqueo} = (3.1 \cdot \text{furosina} \cdot 100) / (\text{lisina cromatografiada} + 1.86 \cdot \text{furosina})$$

Esta fórmula se utiliza cuando en la determinación de furosina la hidrólisis se realiza con HCl 6 M (Bujard y Finot, 1978; Finot et al., 1981; Pizzoferrato et al., 1998); si se usa HCl de distinta concentración se requiere una transformación previa de los valores de furosina obtenidos.

El contenido de furosina se ha determinado en papillas infantiles a base de cereales únicamente y con leche añadida (Carratù et al., 1993) y en productos elaborados sólo a base de frutas (Rada-Mendoza et al., 2002a). Se ha estudiado el efecto del procesado sobre el contenido de furosina en papillas a base de cereales con soja, miel o frutas añadidas (Guerra-Hernández y Corzo, 1996; Guerra-Hernández et al., 1999) y el efecto del almacenamiento en papillas a base de cereales únicamente (Ramírez-Jiménez et al., 2003), con leche añadida (Ramírez-Jiménez et al., 2004a) y sólo a base de frutas (Rada-Mendoza et al., 2004). Pero sucede que en los estudios realizados la composición (ingredientes y contenido), los métodos de procesado y las condiciones de almacenamiento, que son factores que pueden afectar a la calidad proteica del producto final, son muy diversos.

#### 3.4.2. Indicadores de las etapas avanzadas de la RM

Se han determinado distintos compuestos derivados del furfural, como 5-hidroximetil-2-furfuraldehído (HMF), 2-furaldehído, 2-

furilmetilcetona y 5-metil-2-furaldehído para estimar el alcance de la RM durante el procesado y almacenamiento de leche (Fink y Kessler, 1986; Morales et al., 1997; Claeys et al., 2003), fórmulas para lactantes (Albalá-Hurtado et al., 1997b; Ferrer et al., 2002 y 2005a, Chávez-Servín et al., 2006) y papillas infantiles a base de frutas (Rada-Mendoza et al., 2002b y 2004) y a base de cereales únicamente o con soja, miel o frutas añadidas (Ramírez-Jiménez et al., 2003; Fernández-Artigas et al., 1999b).

Otro modo de evaluar las etapas avanzadas de la reacción es a través de la medida de AGEs. Los compuestos de Amadori, formados en las etapas iniciales, pueden entrecruzarse con proteínas adyacentes o con otros grupos amino en etapas avanzadas originando agregados poliméricos denominados AGEs. Estos compuestos, además de formarse en los alimentos, pueden producirse también *in vivo* durante determinados procesos fisiopatológicos, como enfermedades crónicas inflamatorias, diabetes y otros trastornos relacionados con la edad. Sin embargo, los AGEs procedentes de la dieta son los que contribuyen en mayor proporción al total de estos compuestos presentes en el organismo y una ingesta excesiva podría jugar un papel importante en el desarrollo de las patologías mencionadas (Silván et al., 2006). Un 10% de los AGEs que se ingieren con la dieta se absorben y alcanzan la circulación, de los cuales dos tercios son retenidos en los tejidos (Hofmann et al., 2002). La incidencia sobre la salud humana de estos compuestos justifica la necesidad de disponer de buenos métodos de detección.

Muchos AGEs, a diferencia de los compuestos de Amadori, presentan fluorescencia intrínseca por lo que la medida de la intensidad de

fluorescencia ha sido ampliamente utilizada como marcador de las etapas avanzadas de la RM. Las rutas de formación de AGEs no se conocen en su totalidad, y las estructuras de muchos de estos compuestos se desconocen, pero las longitudes de onda de excitación y emisión que los caracterizan están en los intervalos  $\lambda_{ex}$  340-370 nm y  $\lambda_{em}$  420-440 nm, excepto los AGEs que contienen arginina en su estructura, que presentan  $\lambda_{ex}$  320 nm y  $\lambda_{em}$  380 nm (Morales y van Boekel, 1997; Ferrer et al., 2000a; Matiacevich et al., 2005). En una revisión reciente (Matiacevich et al., 2005), el intervalo de longitudes de onda de emisión se amplía hasta 470 nm.

El FAST index (Fluorescencia de los productos avanzados de la RM y triptófano soluble) es un método propuesto por Birlouez-Aragon et al. (1998) para evaluar los efectos debidos al tratamiento térmico de la leche, que se basa en la determinación de la fluorescencia del triptófano ( $\lambda_{ex}$  290 nm,  $\lambda_{em}$  340 nm) y de los AGEs fluorescentes ( $\lambda_{ex}$  350 nm,  $\lambda_{em}$  440 nm) en la fracción de la leche soluble a pH 4.6. La fluorescencia del triptófano es un indicador de la desnaturalización proteica y los AGEs, de la pérdida del valor nutritivo de las proteínas por el desarrollo de la RM. El FAST index es el porcentaje de la relación entre la fluorescencia de los AGEs y del triptófano (Birlouez et al., 2002).

La medida de fluorescencia a diferentes longitudes de onda o el FAST index se han utilizado para evaluar el progreso de la RM debido al tratamiento térmico o procesado de la leche (Morales et al., 1996a; Birlouez-Aragon et al., 1998; Siegl et al., 2000; Birlouez-Aragon et al., 2001; Leclère y Birlouez-Aragon, 2001; Kulmyrzaev y Dufour, 2002;

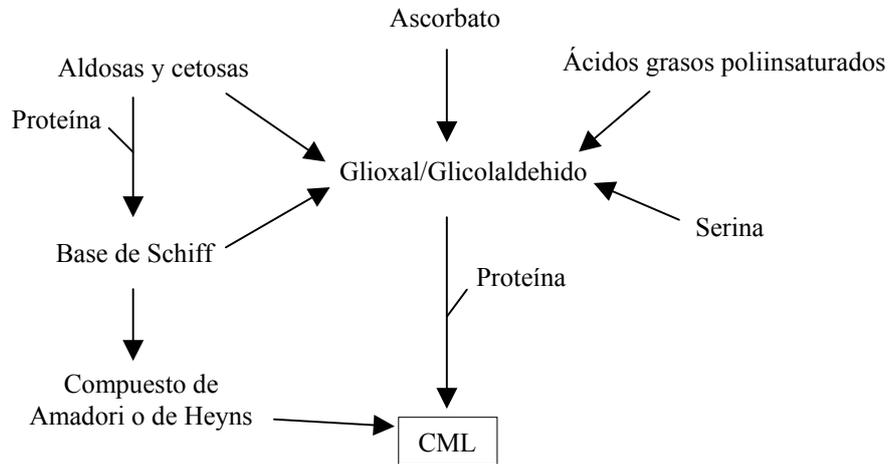
Birlouez-Aragon et al., 2002; Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005; Guan et al., 2005) y fórmulas para lactantes (Ferrer et al., 2000a; Birlouez-Aragon et al., 2004; Birlouez-Aragon et al., 2005). En cambio, son escasos los estudios acerca de los efectos del almacenamiento en la formación de compuestos fluorescentes en formulas para lactantes (Ferrer et al., 2005b) y leches (Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005; Birlouez-Aragon et al., 1999), y no existen estudios sobre la formación de estos compuestos en papillas infantiles, como consecuencia del procesado ni del almacenamiento.

Algunos autores han determinado AGEs individuales, como la pentosidina, la pirralina, la imidazolona y la CML, en lugar de hacer una determinación global (Ferrer et al., 2000a).

La CML es uno de los AGEs sin fluorescencia intrínseca mejor caracterizados, y se forma por degradación oxidativa del compuesto de Amadori o por reacción de la lisina con productos de autooxidación del ácido ascórbico. Además puede formarse durante la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y oxidación de la serina en presencia de proteínas (ver figura 6) (Dunn et al., 1990; Reddy et al., 1995; Fu et al., 1996; Hasenkopf et al., 2002; Nurnsten, 2005). Se ha determinado en leche, fórmulas para lactantes y otros productos lácteos por CG (Büser y Erbersdobler, 1986; Büser et al., 1987; Erbersdobler and Dehn-Müller, 1989; Charissou et al., 2007), CLAR (Hartkopf et al., 1994; Hewedy et al., 1994; Drusch et al., 1999; Fenaille et al., 2006) y ELISA (Tauer et al., 1999; Golberg et al., 2004; Birlouez-Aragon et al., 2004 y 2005; Dittrich

et al., 2006), y en papillas a base de cereales se ha determinado por CLAR (Hartkopf et al., 1994).

Figura 6. Vías de formación de CML *in vitro*.



A pesar de que se ha detectado un incremento en los niveles de CML en tejidos, suero y orina con la edad y en individuos con diabetes y enfermedades crónicas relacionadas con la edad, como osteoporosis, Alzheimer, aterosclerosis o fallo renal (Dunn et al., 1991; Berg et al., 1998; Thornalley et al., 2003; Hein et al., 2003; Gironés et al., 2004), y se ha visto que la ingesta dietética de CML aumenta estos niveles (Koschinsky et al., 1997; Krajcovicová-Kudlácková et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Cai et al., 2002; Uribarri et al., 2003; Vlassara, 2005; Sebeková et al., 2001 y 2005; Somoza et al., 2006), existen pocos

trabajos del mecanismo de actuación a nivel celular de la CML y controvertidos en cuanto a la toxicidad de este compuesto.

Basta et al. (2002) detectan un mecanismo de amplificación de la respuesta inflamatoria producido por la CML a través de la interacción con un receptor para AGEs (RAGE) en la aterogénesis y las patologías crónicas inflamatorias. Sin embargo, Takeuchi and Yamahishi (2004) incluyen a la CML dentro del grupo de AGEs no tóxicos.

Quedan muchos estudios por hacer para saber los mecanismos de acción de los AGEs, incluyendo a la CML, así como su efecto acumulativo y su toxicidad a corto y largo plazo. Si bien, los estudios realizados sobre estos PRM muestran, principalmente, sus efectos perjudiciales y existen pocos acerca de su papel beneficioso. Tampoco tienen un impacto relevante en propiedades sensoriales y desde el punto de vista nutricional son negativos porque causan una disminución del contenido de aminoácidos esenciales.

#### 3.4.3. Indicadores de las etapas finales de la RM

Las melanoidinas formadas en las etapas finales de la RM presentan estructuras, en su mayoría no indentificadas, que dependen de la composición del alimento y de las condiciones tecnológicas aplicadas. Se encuentran en muchos alimentos tratados térmicamente y tienen una contribución significativa en la dieta, con una ingesta promedio estimada de gramos por día (Silván et al., 2006).

La pronil-L-lisina es una melanoidina, que resulta de la reacción entre lisina y acetilformoína, cuya estructura ha sido identificada por CG-MS en la corteza y miga del pan. Se le atribuyen propiedades antioxidantes y se ha observado que induce a la glutatión-S-transferasa, pudiendo prevenir el desarrollo de cáncer (Silván et al., 2006).

Puesto que la RM da lugar a la formación de melanoidinas o pigmentos pardos en las etapas finales, la medida del color es un indicador del avance de la reacción. Los cambios en el color se pueden medir por espectrofotometría en el intervalo de longitudes de onda de 390-500 nm (índice de pardeamiento a 420 nm) o mediante los analizadores del color Tristimulus que dan valores de X, Y, Z (escala CIElab) o valores de L\* (luminosidad o brillo: L\*=0 negro y L\*=100 blanco), a\* (componente rojo-verde: rojo para valores positivos y verde para negativos) y b\* (componente amarillo-azul: amarillo para valores positivos y azul para negativos) (valores Hunter) (Ferrer et al., 2000a; Calvo, 2004).

Los cambios en el color como consecuencia del tratamiento térmico o almacenamiento se han evaluado en leche (Kessler y Fink, 1986; Pagliarini et al., 1990; Rampilli y Andreini, 1992) y en fórmulas para lactantes (Ferrer et al., 2005b; Rossi y Pompei, 1991; Guerra-Hernández et al., 2002). En papillas a base de cereales con o sin leche añadida, sólo se conocen tres estudios sobre la evaluación del efecto del tratamiento térmico (Fernández-Artigas et al., 1999b) o almacenamiento (Ramírez-Jiménez et al., 2003; Ramírez-Jiménez et al., 2004a) sobre el color.



## Parte experimental

---



## 1. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS

### 1.1. Instrumentación

- Agitador de tubos Vortex WhirliMixer (Fisons Scientific equipment, UK).
- Balanza de precisión  $\pm 0.0001\text{g}$  HA-180M (AND, Japan).
- Baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona, España).
- Baño Digiterm 100,  $-20$  a  $100\pm 0.05^\circ\text{C}$  (Selecta).
- Bloque calefactor Stuart Scientific SHT200D ( $20$ - $199.9^\circ\text{C}$ ) (Bibby Sterilin, Stone, Staffordshire, UK).
- Centrífuga 3K15 (Sigma Laborzentrifugen, GmbH. Osterode am Harz, Germany).
- Centrífuga Biofuge 22R con rotor 3744 (Heraeus, Hanau, Germany).
- Centrífuga GT 422 (Jouan, St Nazaire, Francia).
- Colorímetro Hunter Labscan II (Hunter associates laboratory, INC. Reston, Virginia, USA).
- Equipo para filtración de disolventes acoplado a sistema de vacío (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Estufa UT 6060 (Heraeus).
- Fluorímetro RF-5000 (Shimadzu, Kyoto, Japan).
- Homogeneizador Ultra-Turrax T-25 Basic (IKA-Werke, Staufen, Germany).
- Horno Mufla HM-9 (Raypa, Terrassa, España).

- Horno para columna 7970 (Jones Chromatography, Hengoed, Wales, UK).
- Horno para columna HIC-6A (Shimadzu).
- Instrumento de medición de la actividad de agua ( $A_w$ ) Pawkit (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA) calibrado con cloruro sódico 6.0 M.
- pHmetro GLP21 (Crison, Barcelona, España).
- Rotavapor (sistema de vacío V-800, rotavapor R-200, baño de rotavapor B-490) (Büchi, Flawil, Switzerland). Sistema de refrigeración acoplado F12 (Julabo, Seelbach, Germany).
- Sistema de agua ultrapura Milli-Q- Plus (Millipore).
- Sistema de CLAR (Shimadzu Europe GmbH, Duisburg, Germany) formado por:
  - Dos bombas LC-10AD.
  - Inyector manual de volumen variable 7725 (Rheodyne, Cotati, CA, USA) con bucle de 20  $\mu$ L.
  - Detector UV-visible SPD-10AV.
  - Módulo CBM-10A (communications bus module) para la comunicación del equipo con el sistema de adquisición y procesado de datos.
  - Sistema de adquisición y procesado de datos CLASS LC-10 S/W e impresora Hewlett Packard Deskjet 600.
- Sistema de CLAR (Waters, Milford, MA, USA) formado por:
  - Bomba cuaternaria 600E.
  - Desgasificador a vacío para cuatro eluyentes.

- Inyector manual de volumen variable 7725 (Rheodyne) con bucle de 5  $\mu\text{L}$ .
- Detector de fluorescencia M474.
- Sistema de adquisición y procesado de datos Millenium 32 Chromatography Manager Single System (versión 3.2, revisión 1.0) e impresora Hewlett Packard Deskjet 600.
- o Sistema de CG (Hewlett Packard 6890, Waldbronn, Alemania) formado por:
  - Inyector.
  - Horno para columna.
  - Gas portador  $\text{N}_2$ .
  - Detector de ionización de llama (FID).
  - Sistema de adquisición y procesado de datos HP ChemStation (Hewlett Packard, Wilmington, DE, USA).
- o Sistema de CG-MS [CG (Hewlett Packard 6890) acoplado a Espectrómetro de Masas cuadrupolar (Hewlett Packard 5973, Palo Alto, CA, USA)] formado por:
  - Inyector.
  - Horno para columna.
  - Gas portador He.
  - Detector MS modo EI (impacto electrónico) a 70 eV.
  - Sistema de adquisición y procesado de datos G1701CA ChemStation (Hewlett Packard).
- o Sistema de vacío compuesto por:
  - Bomba de aceite para vacío RD-9 (Tesltar, Terrassa, España).

- Trampa RCT60 (Jouan, St Herblain, Francia).
- Centrífuga Speed Vac Plus AR SC110 (Savant Instruments. Inc, Farmingdale, NY).
- o Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

## 1.2. Material

- o Cartuchos para extracción en fase sólida Sep-Pak C<sub>18</sub> plus (Waters).
- o Cubeta de cuarzo con paso de luz de 10 mm (Hellma, Mullheim, Alemania).
- o Filtros de papel de diámetro 125 mm (Albet, Barcelona, España).
- o Filtros de tamaño de poro de 0.20 µm (Millipore) y:
  - 47 mm de diámetro para filtración de disolventes.
  - 13 mm de diámetro para filtración de patrones y muestras.
- o Filtros para centrífuga Centricon YM-10 (Millipore).
- o Jeringa de inyección 100 µL (Exmire Microsyringe, ITO Corporation, Fuji, Japan).
- o Jeringa de inyección 10 µL (SGE, Australia).
- o Jeringa 10 mL Luer lock con aguja (SGE).
- o Microtubos de 1.5 mL (Eppendorf).
- o Papel indicador de pH Universalindikator pH 1-14 (Merck, Darmstadt, Germany).
- o Pipetas automáticas de volumen regulable (Eppendorf).
- o Tubos de centrífuga Oak Ridge de polipropileno copolímero y capacidad 10 mL (Nalge Nunc International, USA).

- Tubos de ensayo Pyrex de 10 mL con tapón de rosca de baquelita y junta de teflón (Bibby Sterilin).
- Tubos de polipropileno de 50 mL para centrífuga (Costar, USA).
- Tubos de vidrio para centrífuga Savant (Afora, Barcelona, España).
- Viales de vidrio de 13 mL (Santos, Madrid, España).
- Viales de vidrio topacio de 1.5 mL con tapón roscado de baquelita, septum de caucho rojo y junta de teflón (Afora).

Los tubos y viales utilizados en la preparación de muestras y patrones se limpian previamente en el horno Mufla a 450°C durante 3-4 horas.

### 1.3. Reactivos

- Acetato sódico anhidro (Panreac, Barcelona, España).
- Acetonitrilo para CLAR (J.T.Baker, Deventer, Holanda).
- Ácido acético glacial 100% y densidad 1.05 Kg/L (Merck).
- Ácido bromhídrico 47% (Merck).
- Ácido clorhídrico 37 % y densidad 1.19 (Merck).
- Ácido 2,6-diaminopimélico o DAP 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se prepara una disolución de DAP 16 mg/100 mL en HCl 0.1N.
- Ácido fórmico 98-100% (Merck).
- Ácido glioxílico monohidrato (Sigma-Aldrich).
- Ácido L- $\alpha$ -amino-n-butírico (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), utilizado como patrón interno en la determinación de

aminoácidos. Se prepara una disolución madre 2.5 mM en HCl 0.1M estable 6 meses a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Ácido sulfúrico 95-97% y densidad 1.84 (Merck).
- Ácido tricloroacético (TCA) microselectivo  $\geq 99.5\%$  (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Agua Milli-Q plus.
- Albumina bovina sérica o BSA (A2153-10G) (Sigma-Aldrich).
- $\beta$ -Caseína (Casein from bovine milk purified powder) (Sigma Chemical Co).
- Cianoborohidruro sódico (Fluka).
- Cloruro sódico (Normapur, Prolabo, Fontenay-sur-Bois, Francia).
- Diclorometano (Merck).
- Dihidrogenofosfato sódico monohidrato (Merck).
- Eluyente A AccQ.Tag concentrado (disolución acuosa de tampón acetato-fosfato, que consiste en acetato sódico 140 mM con trietilamina 17 mM a pH 5.05 con ácido fosfórico que contiene 1mg/L de ácido etilendiaminotetraacético o EDTA) (Millipore).
- Fosfato de sodio doce hidrato (Panreac).
- Fosfato de sodio monohidrato (Panreac).
- Gluten de trigo (Sigma-Aldrich).
- Heptanosulfonato de sodio (Sigma-Aldrich).
- Hidrogenofosfato disódico (Merck).
- Hidróxido de bario octa-hidratado ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) (Panreac).
- Hidróxido sódico (Merck).
- Lisinoalanina (Bachem AG, Bubendorf, Suiza).
- Metanol (Merck).

- Mezcla patrón de aminoácidos comercializada con concentración 2.5 mM de cada aminoácido, excepto de cistina (1.25 mM) (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA).
- N,N-Dimetilformamida para síntesis (Merck).
- N-Metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida o MTBSTFA (Fluka).
- N<sup>ε</sup>-Carboximetil-L-lisina (NeoMPS Groupe SNPE, Strasbourg, France). Se prepara una disolución de concentración 16 mg/100 mL en HCl 0.1N. La disolución se almacena a -20°C o a 4° C si se va a utilizar.
- Patrón de furosina (Neosystem, Strasbourg, France). Se prepara una disolución del patrón de furosina 72 µg/mL en ácido clorhídrico 0.1M y se almacena a -20°C.
- Patrón de L-ácido cisteico monohidratado (CysA.H<sub>2</sub>O) y L-metionina sulfona (MetS) (Sigma Chemical Co). Se prepara una disolución de patrón de CysA o MetS 2.5 mM en HCl 0.1M, estable 6 meses a -20°C.
- Patrón de L- triptófano (Sigma Chemical Co). Se prepara una disolución de patrón de Trp 20 nmol/µL en ácido acético 0.1N, estable al menos durante 1 año en refrigeración a 4°C.
- Peróxido de hidrógeno 30% (p/p) (Fluka).
- Pronasa de *Streptomyces griseus* 5.1 U/mg (Fluka). Se prepara una disolución (60U/mL) disolviendo 11.76 mg de pronasa en 1 mL de disolución tampón Tris a pH 7.2.
- Proteína de soja 90% (Manuel Riesgo, S.A., Madrid, España).

- Reactivo AccQ.Fluor (Millipore). Kit compuesto por tampón borato, reactivo en polvo (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato o AQC) y acetonitrilo como diluyente. Para reconstituir el reactivo AccQ.Fluor, se añade 1 mL de acetonitrilo al reactivo AQC, se agita durante 10 segundos y se calienta sobre un bloque calefactor a 55°C no más de 10 minutos. La estabilidad del reactivo reconstituido es de 1 semana en desecador a temperatura ambiente.
- Sulfato de quinina (Guinama, Valencia, España). Se prepara una disolución madre de patrón de sulfato de quinina 100 mg/L en ácido sulfúrico 0.1 N.
- Trietilamina para síntesis (Merck).
- Tris (Tris (hidroximetil) aminometano o Trizma base) 99.9% (Sigma-Aldrich). Se prepara una disolución tampón Tris a pH 7.2, mezclando 50 mL de disolución Tris 0.2M y 44.2 mL de ácido clorhídrico 0.2 M y enrasando a 200 mL con agua.

#### *Ácido perfórmico*

El ácido perfórmico se prepara con ácido fórmico y peróxido de hidrógeno mezclados en la proporción 9:1 v/v. La disolución se mantiene 1 hora en la campana de extracción a temperatura ambiente y se almacena después 1 hora a 0°C.

#### *Caseína utilizada en la preparación de sistemas modelo*

La leche de vaca se desnata manteniéndola previamente en un baño a 30°C durante 20 minutos y centrifugándola a 4500 g durante 15

minutos y a 5°C. Posteriormente, se lleva a un baño de hielo durante 30 minutos. Por último, se retira la grasa y se filtra a través de lana de vidrio. La caseína se precipita por acidificación a pH 4.6 con HCl 1 M, seguido de una centrifugación a 4500 g durante 15 minutos a 5°C. El sobrenadante se desecha, y se lava el precipitado 3 veces con tampón acetato (10% de ácido acético y acetato sódico 1 M, pH 4.6). A continuación, la grasa remanente se elimina del precipitado de caseína con una mezcla de diclorometano: tampón acetato 1:1 (v/v) y, finalmente, se liofiliza.

*Disolución de tampón fosfato salino 20 mM, 15 mM NaCl, pH 7*

- a) 2.78 g de fosfato de sodio monohidrato se disuelven en 100 mL de agua.
- b) 7.17 g de fosfato de sodio doce hidrato se disuelven en 100 mL de agua.

Se mezclan 39 mL de a y 61 mL de b y el volumen se completa a 200 mL con agua. A 50 mL de esta disolución se le añaden 0.2194 g de cloruro sódico y el volumen se completa a 250 mL con agua.

*Patrón de calibración de aminoácidos con patrón interno (ácido L- $\alpha$ -amino-n-butírico) 0.1 mM*

Se prepara mezclando 40  $\mu$ L de disolución madre de patrón interno 2.5 mM, 40  $\mu$ L de mezcla patrón de aminoácidos 2.5 mM y 920  $\mu$ L de agua Milli-Q plus. Es estable 1 mes a -20 °C.

*Patrón de MetS y CysA con patrón interno 0.1 mM*

Se prepara mezclando 40  $\mu$ L de disolución madre de patrón interno 2.5 mM, 40  $\mu$ L de patrón MetS 2.5 mM, 40  $\mu$ L de patrón CysA 2.5 mM y 880  $\mu$ L de agua Milli-Q plus. Es estable 1 mes a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Preparación de tampón fosfato salino 0.2M a pH 8*

Se mezclan 2.65 mL de dihidrogenofosfato sódico 0.2M y 47.35 mL de hidrogenofosfato disódico 0.2M. Se comprueba el pH.

## 2. MUESTRAS

### 2.1. Papillas de cereales con leche (PCL)

#### 2.1.1. Descripción y composición

Se seleccionan para este estudio tres muestras de PCL listas para el consumo (Hero España S.A.) compuestas por un 88% de leche y un 8.8% de harina hidrolizada de ocho cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo). Las tres muestras (A, B y C) presentan la misma composición y sólo difieren en un ingrediente minoritario: la muestra B contiene miel (0.9% p/v) y la muestra C contiene frutas (plátano, naranja y manzana) (1.1% p/v). La densidad de las muestras es de 1.08 g/mL.

El valor energético y la composición de las PCL estudiadas se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Valor energético (kcal/100g) y composición (g/100g) de las PCL estudiadas.

	A	B	C
Energía	97	96.1	97
Proteínas	3.4	3.5	3.5
Hidratos de carbono	16.1	15.7	15.8
Grasas	2.9	2.9	2.9

En el cuadro 8 se indican los minerales y las vitaminas que contienen las tres muestras estudiadas.

Cuadro 8. Vitaminas y minerales que contienen las PCL estudiadas.

	Por 100 g
Vitamina B1 (mg)	0.2
Vitamina B2 (mg)	0.1
Niacina (mg)	1.1
Ácido pantoténico (mg)	0.4
Vitamina B6 (mg)	0.1
Biotina (µg)	6.5
Ácido fólico (µg)	15.0
Vitamina B12 (µg)	0.2
Vitamina C (mg)	9.7
Vitamina A (µg)	82.1
Vitamina D (µg)	1.3
Vitamina E (mg)	1.1
Sodio (mg)	54.0
Calcio (mg)	118.0
Cinc (mg)	0.4
Fósforo (mg)	108.0
Hierro (mg)	1.1
Yodo (µg)	6.5

La actividad de agua ( $A_w$ ) y el pH de las tres papillas es  $1.00\pm 0.01$  y  $6.59\pm 0.05$ , respectivamente.

### 2.1.2. Proceso de fabricación

En la fabricación de las muestras se utilizan las siguientes materias primas:

- Leche desnatada en polvo secada por spray (88%). El proceso al que se somete la leche comprende las siguientes etapas: pasteurización, desnatado, bactofugación, concentrado, enfriado, mezclado con la grasa, pasteurización, homogeneización, secado por spray.

- Harina de 8 cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo) hidrolizada con  $\alpha$ -amilasa y tostada (8.8%). La hidrólisis enzimática de los cereales proporciona azúcares de menor peso molecular y modifica la estructura del almidón sin reducir su valor nutritivo. Ello permite una mejor asimilación del producto, pues la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en los lactantes es baja, en especial en los primeros meses de vida. Durante el tostado, se produce una dextrinación térmica y se desarrollan aromas, siendo éste un factor importante en el estímulo digestivo del lactante.

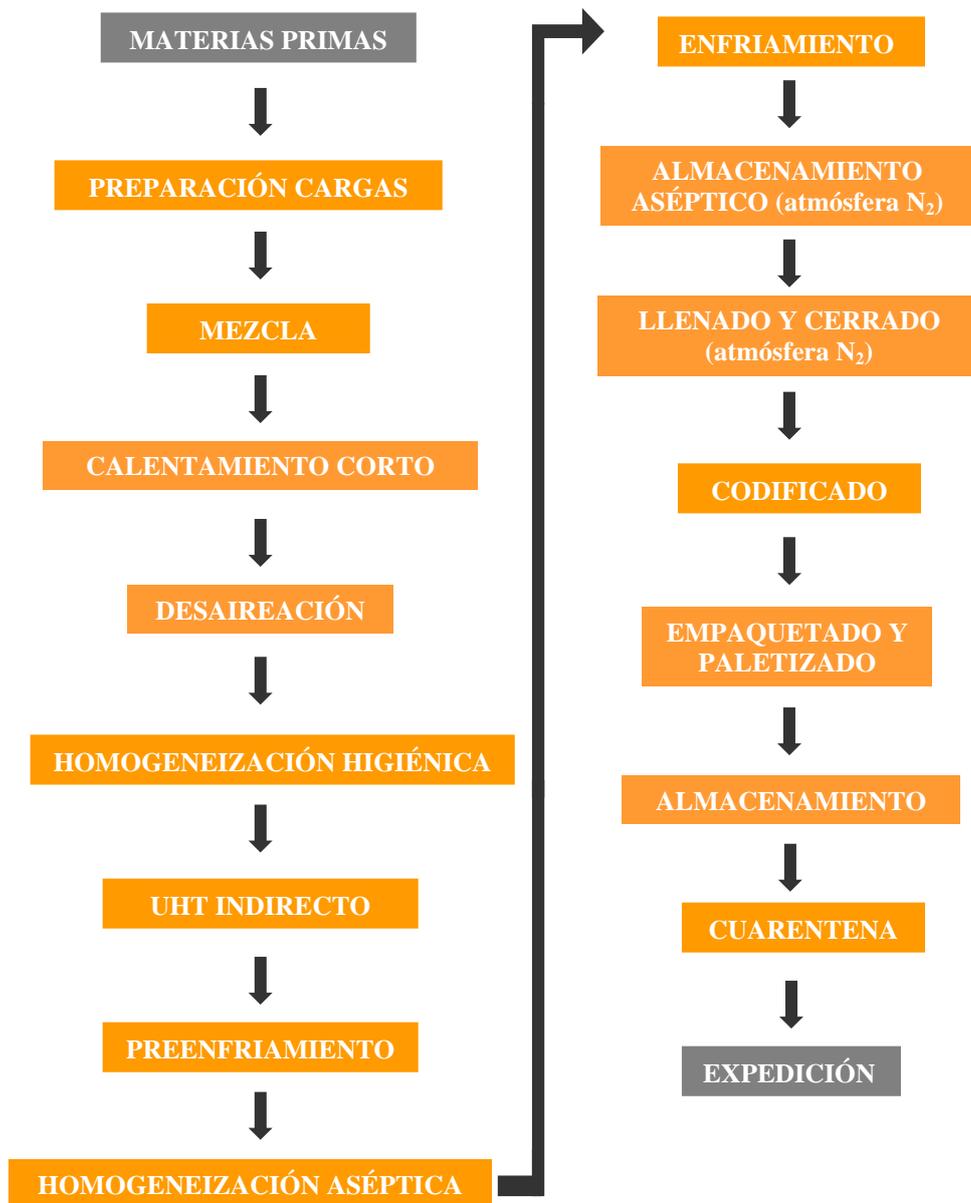
La hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química, pues esta última requiere una neutralización del producto, lo que implica un aumento en el contenido de sales, no adecuado para la alimentación durante el primer año de vida. Además, disminuye el valor

nutritivo y se suelen originar compuestos no deseables por degradación del sustrato (Ramírez-Jiménez, 2001).

- Frutas (plátano, manzana y naranja) en forma de copos deshidratados (1.1% y sólo en muestra C)
- Miel (0.9% y sólo en muestra B)
- Mezcla de vitaminas (B1, B2, niacina, ácido pantoténico, B6, biotina, ácido fólico, B12, C, A, D)
- Mezcla de minerales (calcio, fósforo y hierro)
- Azúcar
- Aceites vegetales
- Aroma de vainilla, en las muestras A y B
- Aromas naturales, en la muestra C

El diagrama de fabricación de las PCL se indica en la figura 7. La adición de miel o frutas en las muestra B y C, respectivamente, se realiza en la etapa de mezcla anterior al tratamiento térmico a 90°C.

Figura 7. Diagrama de fabricación de las PCL.



### 2.1.3. Muestreo

El objetivo del estudio es determinar la influencia del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la evolución de la RM y, en consecuencia, en la estabilidad de la fracción proteica de cada una de las papillas. Para ello se aplica un diseño factorial completo que consta de 3 factores, con distinto número de niveles:

- Tiempo de almacenamiento con 9 niveles (0, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 meses)
- Temperatura de almacenamiento con 3 niveles (25, 30 y 37 °C)
- Tipo de muestra con 3 niveles (muestra A, B y C)

Se pretende hacer un mínimo de 4 determinaciones de cada uno de los parámetros analíticos considerados.

La actividad de agua ( $A_w$ ) y el pH no cambiaron a lo largo del período de almacenamiento.

## 2.2. Otros alimentos

La determinación de la CML se realiza en las PCL, anteriormente descritas, para el punto 0 de almacenamiento y para el punto 9 de almacenamiento a 37°C. Además, este parámetro se determina en una serie de alimentos que se describen a continuación:

- Clara de huevo cocida durante 30 y 60 minutos. Los huevos son de gallina, clase A y tamaño medio (53-63 g). El punto de ebullición se alcanzó después de 14 minutos de calentamiento. Las muestras se guardan a -20°C hasta el análisis.

- Leche desnatada esterilizada.

- Leche desnatada condensada.

- Leche entera en polvo.

- Leche evaporada, que consiste en leche entera concentrada por evaporación de gran parte de agua y posteriormente esterilizada (materia grasa 8% y extracto seco magro lácteo 20%).

- Batido de leche con cacao UHT, que contiene leche (materia grasa 2.1%), azúcar, cacao (mínimo 0.9%) y estabilizadores.

- Pan de trigo.

- Bebida de soja (de dos marcas comerciales 1 y 2).

- Preparado en polvo para elaborar crepes, cuyos ingredientes son harina de trigo, leche en polvo, azúcar, grasa vegetal en polvo, huevo en polvo deshidratado y sal.

El contenido proteico en estas muestras se indica en el cuadro 9.

Cuadro 9. Cantidad de proteína presente en los alimentos en los que se realiza la determinación de CML.

	g proteína /100 g muestra
Clara de huevo	10.0
Leche desnatada esterilizada	3.2
Leche desnatada condensada	6.0
Leche entera en polvo	25.0
Leche entera evaporada	7.0
Batido de leche con cacao	3.0
Pan de trigo	8.6
Bebida de soja	3.5
Preparado en polvo para elaborar crepes	3.0

---

### 3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

#### 3.1. Aminoácidos

El método seleccionado para la determinación de los aminoácidos proteinogénicos en las PCL con leche es la CLAR en fase reversa con detección de fluorescencia, previa formación de un derivado fluorescente con el reactivo AQC. Los aminoácidos se liberan por hidrólisis ácida, y en el caso de los aminoácidos azufrados cisteína (Cys) y metionina (Met), se requiere una oxidación perfórmica previa para convertirlos en ácido cisteico (CysA) y metionina sulfona (MetS), respectivamente, compuestos más estables frente a la hidrólisis (Bosch et al., 2006).

El triptófano se determina por CLAR en fase reversa con detección UV sin derivatización previa, tras una hidrólisis básica (Viadel et al., 1999).

##### 3.1.1. Preparación de la muestra

###### *Hidrólisis ácida*

Las muestras (0.666g) se pesan en tubos Pyrex de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón. Se añaden 5mL de HCl 6N (relación de 5.06 mg proteína/ mL HCl) y se agita. Se borbotea nitrógeno durante 1 minuto para crear una atmósfera inerte. La hidrólisis se lleva a cabo a 110°C durante 23 horas. A continuación se deja enfriar a temperatura ambiente.

Los hidrolizados se pasan por filtros de papel humedecidos (para favorecer la filtración) y los filtrados se recogen en matraces aforados de 250 mL. Se añaden 10 mL de disolución madre de patrón interno (ácido L- $\alpha$ -amino-n-butírico) 2.5mM, para obtener una concentración de 0.1mM (igual a la del patrón de calibración de aminoácidos con patrón interno). El matraz se enrasa con agua Milli-Q plus hasta 250 mL.

Las muestras diluidas se pasan por filtros de 0.20  $\mu$ m y se procede a su derivatización.

#### *Oxidación con ácido per fórmico (Cys y Met)*

Las muestras (0.666g) se pesan en tubos de vidrio para centrifuga Savant. Se añaden 2 mL de ácido per fórmico recién preparado y se dejan 16 horas en un baño de hielo a 0°C. Se adicionan 0.3 mL de ácido bromhídrico para interrumpir la oxidación y eliminar el exceso de ácido per fórmico. Las muestras oxidadas se llevan a sequedad en el sistema de vacío. Se añaden 5 mL de HCl y se transfieren a tubos Pyrex de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón, para realizar la hidrólisis ácida según se ha indicado.

#### *Derivatización (método AQC)*

Se introducen 10  $\mu$ L de hidrolizado, previamente filtrado, en un vial de vidrio topacio de 1.5 mL, se añaden 70  $\mu$ L de tampón borato (porque el intervalo de pH óptimo para la derivatización es 8.2-9.7) y se agita en el vortex. Se adicionan 20  $\mu$ L de reactivo AccQ.Fluor reconstituido e inmediatamente se agita en vortex durante unos segundos,

se deja reposar 1 minuto a temperatura ambiente y se calienta en un bloque a 55°C durante 10 minutos. El calentamiento convierte un producto secundario minoritario de la tirosina biderivatizada en un único monoderivatizado estable y no afecta al resto de aminoácidos.

La muestra derivatizada es estable a temperatura ambiente durante una semana y puede inyectarse directamente en el cromatógrafo.

#### *Hidrólisis básica (Trp)*

Las muestras (2.289 g) se pesan en un tubo Pyrex de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón. Se añaden 2.625 g de hidróxido de bario octa-hidratado (relación de 2.625 g de hidróxido de bario octa-hidratado/ 0.087 g proteína) y 5 mL de agua a 100°C. La mezcla se agita en vortex. Se burbujea nitrógeno durante 2 minutos manteniendo los tubos en el baño de ultrasonidos y se lleva a 120°C durante 8 horas.

El hidrolizado (aún caliente) se pasa por filtros de papel humedecidos y el filtrado se recoge en matraces aforados de 25 mL. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se ajusta el pH a 4-6 con HCl 18.5% (v/v) utilizando papel indicador del pH y el volumen se completa a 25 mL con agua destilada. El contenido del matraz aforado se transfiere a tubos de polipropileno de 50 mL y se centrifuga a 3000g y 25°C durante 10 minutos. El sobrenadante filtrado (filtros de 0.20 µm) se inyecta directamente en el cromatógrafo.

### 3.1.2. Determinación por CLAR

#### *Aminoácidos resistentes a la hidrólisis ácida y aminoácidos azufrados*

El equipo utilizado es el sistema de CLAR (Waters) descrito en el apartado 1.1. de la parte experimental. Se usa una columna AccQ.Tag específica para análisis de aminoácidos de ODS Nova-Pak C<sub>18</sub> (3.9 x 150 mm, 4 μm) (Waters) y una precolumna Nova-Pak C<sub>18</sub> (3.9 x 20mm, 4 μm) (Waters), que se mantienen a 37 °C durante el análisis. El flujo es de 1 mL/min y el volumen de inyección es de 5 μL. Las fases móviles A, B y C consisten en eluyente A AccQ.Tag diluido (preparado por mezcla de 100 mL de eluyente A AccQ.Tag concentrado y 1L de agua Milli-Q plus, y estable 1 mes a 4°C), acetonitrilo para CLAR y agua Milli-Q plus, respectivamente. El gradiente de elución, optimizado en un trabajo previo (Bosch et al., 2005), se muestra en el cuadro 10. Antes de empezar el gradiente, la columna se equilibra con 100% eluyente A durante 10 minutos.

Después del último análisis del día, la columna se limpia con C durante un mínimo de 30 minutos y luego se acondiciona con B:C 60:40 durante 15-20 minutos. Si la columna no se va a utilizar durante más de 72 horas, se debe mantener en 100% B; y acondicionar con B:C 60:40 durante 5 minutos antes de ser utilizada de nuevo.

Las condiciones del detector de fluorescencia son:  $\lambda$  excitación 250 nm,  $\lambda$  emisión 395 nm, respuesta de 3 segundos en filtro digital, atenuación 2 y ganancia 100.

Cuadro 10. Gradiente de elución seleccionado para la determinación cromatográfica de los aminoácidos.

Tiempo (minutos)	% A	% B	% C
0.00	100.0	0.0	0.0
0.50	99.0	1.0	0.0
18.00	94.0	6.0	0.0
19.00	91.0	9.0	0.0
29.50	83.0	17.0	0.0
38.00	83.0	17.0	0.0
38.01	0.0	60.0	40.0
55.00	0.0	60.0	40.0
55.01	100.0	0.0	0.0

A: Eluyente A AccQ.Tag

B: Acetonitrilo para CLAR

C: Agua Milli-Q plus

### *Triptófano*

Se utiliza el sistema de CLAR (Shimadzu) descrito en el apartado 1.1. de la parte experimental. La columna es una ODS2 Waters Spherisorb (4.6 x 250mm, 5  $\mu$ m) (Waters), que se mantiene a 25 °C durante el análisis. El flujo es de 1 mL/min y el volumen de inyección es de 20  $\mu$ L. Las fases móviles utilizadas son: fase móvil para triptófano (A) (formada por acetato sódico anhidro 0.01 M y 10% acetonitrilo ajustado a pH 5.8 con ácido acético glacial 1M), acetonitrilo:agua 80:20 para CLAR (B) y agua Milli-Q para CLAR (C).

Antes de cada inyección, la columna se equilibra con A 100% (unos 10 minutos). La separación se realiza de modo isocrático con A 100%. Después de cada inyección, la columna se lava con B durante 10 minutos; y después de la última inyección del día, se lava con C (15-20 minutos) y a continuación con B (15-20 minutos).

La detección se realiza con UV a 280 nm.

### 3.1.3. Análisis cualitativo y cuantitativo

#### *Aminoácidos resistentes a la hidrólisis ácida y aminoácidos azufrados*

En los análisis cualitativo y cuantitativo se utilizan los tiempos de retención y el método del patrón interno, respectivamente. El contenido de aminoácidos se determina con la expresión:

$$C_i = (A_i / A_s) \times C_s \times F$$

donde  $C_i$  = contenido (mM) de aminoácidos en la muestra;  $A_i$  = área del aminoácido en la muestra;  $A_s$  = área del patrón interno en la muestra;  $C_s$  = concentración del patrón interno (0.01 mM);  $F$  = factor de respuesta (Lindsay, 1992).

Los factores de respuesta ( $F$ ) se determinan por inyección de patrón de aminoácidos que contiene patrón interno (0.01 mM) varias veces y en días distintos y calculando la relación entre el área del patrón interno y el área de cada aminoácido. Los valores obtenidos se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Factores de respuesta (F) obtenidos para los aminoácidos.

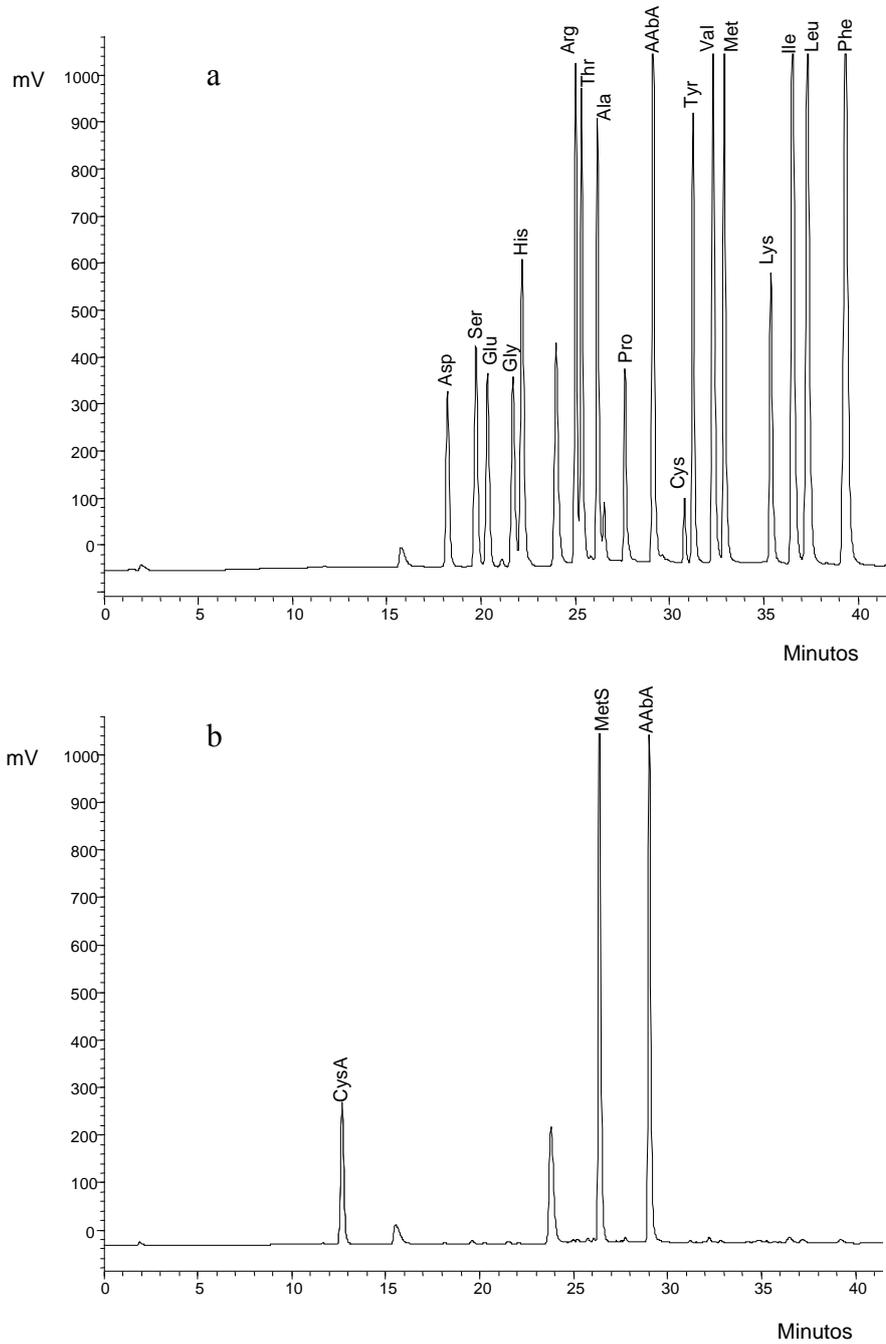
Aa	F	CV (%)	Aa	F	CV (%)
Asp	2.98±0.02	0.84	Tyr	1.61±0.01	0.79
Ser	2.30±0.03	1.35	Val	0.92±0.01	0.60
Glu	2.64±0.01	0.56	Lys	1.99±0.03	1.78
Gly	2.56±0.05	1.81	Ile	0.80±0.01	1.61
His	1.63±0.02	1.03	Leu	0.85±0.01	1.05
Arg	1.52±0.04	2.37	Phe	0.69±0.01	1.04
Thr	1.46±0.04	2.67	CysA	2.99±0.20	6.64
Ala	1.57±0.03	1.63	MetS	0.91±0.06	6.47
Pro	3.33±0.10	2.87			

F: Factor de respuesta

CV: Coeficiente de variación

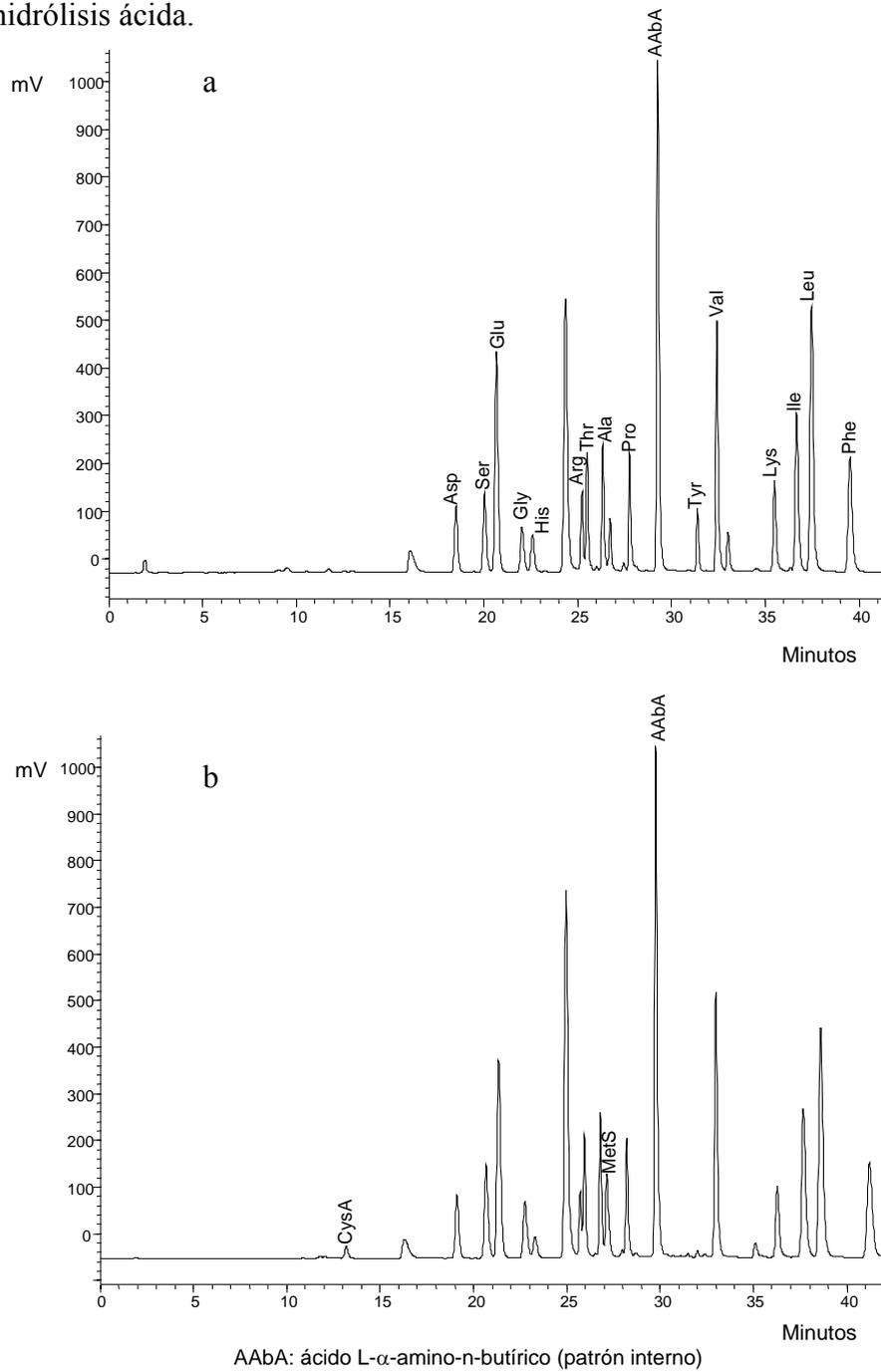
En la figura 8 se muestran los cromatogramas correspondientes a la inyección de patrón de aminoácidos con patrón interno (ácido L- $\alpha$ -amino-n-butírico) 0.01 mM (a) y patrón de MetS y CysA con patrón interno 0.01 mM (b). En la figura 9 se muestran dos cromatogramas correspondientes a los aminoácidos de una muestra de papilla B analizada, obtenidos por hidrólisis ácida sin (a) y con (b) oxidación perfórmica previa.

Figura 8. Cromatograma obtenido para un patrón de aminoácidos (a) y patrón de MetS y CysA (b) (0.01mM de cada aminoácido).



AAbA: ácido L- $\alpha$ -amino-n-butírico (patrón interno)

Figura 9. Cromatogramas correspondientes a los aminoácidos de una papilla B analizada sin (a) y con (b) oxidación perfórmica previa a la hidrólisis ácida.



### *Triptófano*

El análisis cualitativo se hace a partir del tiempo de retención (6.78  $\pm$ 0.09 minutos) y el cuantitativo por calibración externa con una serie de patrones (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 nmol/ $\mu$ L o mM) inyectados. Éstos se preparan a partir de la disolución de patrón de Trp 20 nmol/ $\mu$ L.

### **3.2. Furosina**

La furosina se determina por CLAR en fase reversa con detección UV a 280 nm, según el método aplicado y validado por Ferrer et al. en leche (2000b) y fórmulas para lactantes (2001 y 2003b), matrices similares a las PCL objeto de estudio.

#### 3.2.1. Preparación de la muestra

Se pesan, en tubos Pyrex de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón, alícuotas de muestra que correspondan a 40-50 mg de proteína (1.14-1.43 g). Se añaden 8 mL de HCl 8N y se burbujea nitrógeno durante 1 minuto. La muestra se hidroliza a 110°C durante 23 h. A continuación, se pesan los tubos y se añade, si es necesario, la cantidad suficiente de HCl 8N para recuperar el peso previo a la hidrólisis. El hidrolizado se filtra, recogiendo en tubos opacos. Se toma 1 mL del filtrado y se le añaden 4 mL de HCl 3N (1-2  $\mu$ g proteínas/ $\mu$ L). Se realiza entonces una extracción en fase sólida; para ello, se añaden 0.5 mL del hidrolizado diluido a un cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> plus, acondicionado previamente con 5 mL de metanol y 10 mL de agua, y se descarta el extracto. La furosina se eluye con 3 mL de HCl 3N y se lleva a sequedad con el sistema de vacío a

43°C, disolviendo el residuo en 2 mL de fase móvil. Tras filtrar (0.20 µm), se inyecta en el cromatógrafo.

### 3.2.2. Determinación por CLAR

Se utiliza el sistema de CLAR (Shimadzu) descrito en el apartado 1.1. de la parte experimental. Se utiliza una columna Spherisorb ODS (4.6 x 250mm, 5 µm) (Waters) a 25 °C. El flujo es de 0.8 mL/min y el volumen de inyección, de 20 µL. Las fases móviles consisten en: fase móvil para furosina (A) (formada por heptanosulfonato de sodio 5 mM, 20% de acetonitrilo y 0.2% de ácido fórmico, de preparación diaria), acetonitrilo para CLAR (B) y agua Milli-Q-plus (C).

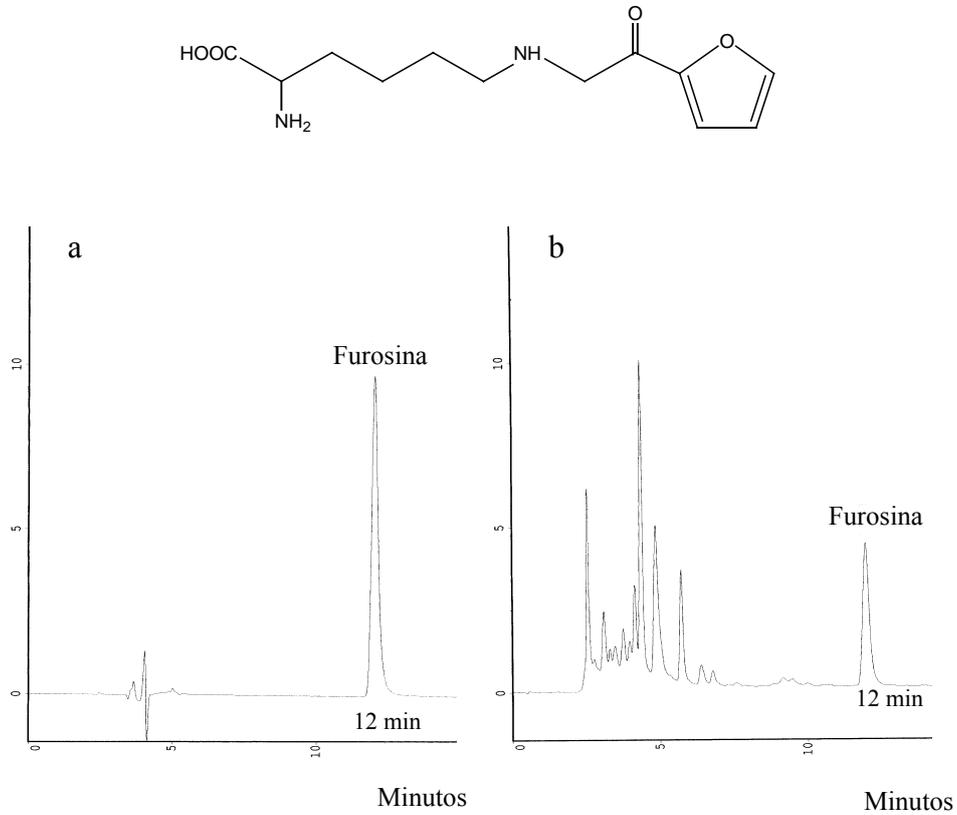
Al principio del análisis, se equilibra la columna con 100% de A (1 hora, aproximadamente). La separación se realiza de modo isocrático con 100% de A. Después de la última inyección, se lava con C y B (20 y 30 minutos, respectivamente).

La detección se realiza con UV a 280 nm.

Se cuantifica con calibración externa (patrones 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 µg/mL). Los patrones se preparan a partir de la disolución de patrón de furosina 72 µg/mL.

En la figura 10 se muestran la estructura de la furosina, un cromatograma correspondiente a la inyección de patrón de concentración 2 µg/mL y otro correspondiente a una muestra analizada de papilla A.

Figura 10. Estructura de la furosina y cromatogramas obtenidos en la determinación de furosina en: (a) patrón de concentración 2  $\mu\text{g/mL}$  y (b) papilla A.



El límite de detección del método, determinado previamente por Ferrer et al. (2003b), es de 0.01 µg/mL en el ensayo, lo que correspondería en muestra a 0.12 mg/100g papilla.

Se comprueba que existe linealidad ( $y=76711.65x-3786.81$ ;  $r=0.9996$ ) en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 8 µg/mL, entre el que se encuentran las muestras analizadas.

La precisión instrumental, calculada a partir de tres inyecciones de un patrón de 2 µg/mL es de 1.3 %. La precisión del método intradía estimada a partir de cuatro alícuotas de muestra analizadas, es de 2.4%.

La exactitud se evalúa mediante ensayos de recuperación añadiendo una cantidad de furosina conocida (0.9 µg/mL) y similar a la de la muestra hidrolizada. El ensayo se hace por triplicado y se obtienen porcentajes de recuperación del  $86.5\pm 5.4\%$ .

### 3.2.3. Cálculo del porcentaje de lisina bloqueada

El porcentaje de lisina bloqueada puede calcularse a partir del contenido de furosina y el valor inicial de lisina determinada por CLAR (según los apartados 3.1.1-3.1.3 de la parte experimental) en la muestra, con la expresión:

$$\% \text{ bloqueo} = (3.1 \cdot \text{furosina} \cdot 100) / (\text{lisina por CLAR} + 1.86 \cdot \text{furosina})$$

Esta fórmula se utiliza cuando en la determinación de furosina la hidrólisis se realiza con HCl 6 M (Bujard y Finot, 1978; Finot et al., 1981; Pizzoferrato et al., 1998); si se usa HCl de una concentración distinta, se

requiere la transformación previa de los contenidos de furosina obtenidos. En la determinación de furosina, la hidrólisis se realiza con HCl 8 M, por lo que, para utilizar la fórmula anterior, se ha de aplicar previamente un factor de corrección de 0.8 a los contenidos de furosina obtenidos, según proponen Evangelisti et al. (1999a).

### **3.3. Compuestos fluorescentes (AGEs)**

Se realiza la medida conjunta de los AGEs fluorescentes y se selecciona además la pentodil-lisina, porque es el único compuesto fluorescente para el que, en estudios previos en fórmulas de base láctea para lactantes, se han observado cambios significativos con el tiempo de almacenamiento (Ferrer et al., 2005b).

Para determinar los compuestos fluorescentes, se prepara una dilución de la muestra que contenga 0.02 g proteína/mL (5.3 g papilla/10 mL).

Se determinan los AGEs y la pentodil-lisina libres (no unidos a proteínas) y totales (libres más unidos a proteínas). Los compuestos unidos a proteínas se liberan mediante una digestión enzimática basada en la acción de la pronasa (Palombo et al., 1984). El procedimiento de determinación es el siguiente:

a) Compuestos libres: 2 mL de muestra diluida se desproteinizan con 2 mL de TCA al 24 % (p/v). Se centrifuga a 13000 g durante 10 minutos a 4°C y se analiza el sobredanante.

b) Compuestos totales: Se añaden 0.4 mL de solución de pronasa E (60 U/mL) a 1.5 mL de muestra diluida y se incuba en un baño a 25°C durante 30 minutos. Se centrifuga a 13000 g durante 10 minutos a 4°C y se analiza el sobredanante.

A 100 µL de cada uno de los sobrenadantes, se le añaden 5 mL de tampón fosfato salino 20 mM, pH 7, 15 mM NaCl.

Se mide la fluorescencia de las muestras, blanco (tampón fosfato salino 20 mM, pH 7, 15 mM NaCl) y patrón de sulfato de quinina, en las siguientes condiciones:

- AGEs:  $\lambda_{\text{excitación}}$  347 nm,  $\lambda_{\text{emisión}}$  415 nm
- Pentodil-lisina:  $\lambda_{\text{excitación}}$  366 nm,  $\lambda_{\text{emisión}}$  440 nm
- Anchura de banda rendija de excitación 5 nm y rendija de emisión 15 nm.

Los resultados se expresan en porcentaje de intensidad de fluorescencia (%IF) respecto a un patrón de sulfato de quinina de 0.5 µg/mL y 7.5 µg/mL (preparados en tampón fosfato salino 20 mM, pH 7, 15 mM NaCl) para AGEs y pentodil-lisina, respectivamente. Las muestras se analizan por cuadruplicado.

#### *Precisión del método*

Se analizan los AGEs y la pentodil-lisina libres y totales de una muestra papilla B en tres días distintos y por cuadruplicado en cada uno de los días. La precisión se muestra en el cuadro 12.

Cuadro 12. Precisión del método de determinación de compuestos fluorescentes expresada en % CV.

	Pentodil-lisina		AGEs	
	Intradía (n=4)	Interdía (n'=3)	Intradía (n=4)	Interdía (n'=3)
	5.79		3.35	
Compuestos	1.60	3.72	4.69	4.93
libres	2.77		3.13	
	2.87		2.16	
Compuestos	2.12	4.38	3.04	3.71
totales	4.31		3.05	

CV (%): Coeficiente de variación

n: Número de determinaciones

n': Número de días

### 3.4. N<sup>ε</sup>-Carboximetil-lisina (CML)

La CML, uno de los AGEs no fluorescentes mejor caracterizados, se determina por CG con detección FID (ionización de llama), previa derivatización con *N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA).

El método se basa en el previamente descrito por Hasenkopf et al., (2002) para la determinación de productos de ascorbilación y glicosilación no enzimática (glicación) de proteínas modificadas. Las condiciones cromatográficas establecidas permiten la evaluación de la

calidad proteica mediante la determinación simultánea de lisina, CML y lisinoalanina o LAL (N<sup>ε</sup>-(D, L-2-amino-2-carboxietil)-L-lisina).

La LAL es un aminoácido artificial que se forma por uniones de entrecruzamiento (*cross-links*) durante el calentamiento de alimentos ricos en proteínas y que se ha utilizado como indicador de daño térmico. Además de la temperatura, el pH elevado y el tiempo de almacenamiento favorecen la formación de LAL. El mecanismo de formación de LAL consta, básicamente, de dos etapas: la primera consiste en la formación de dehidroalanina a partir de o-fosforilserina, o-glicosilserina o cisteína y la segunda es la reacción entre la dehidroalanina y el grupo amino de otro aminoácido, como la lisina (Friedman, 1999; Boschini et al., 1999).

#### 3.4.1. Preparación de la muestra

##### *Preparación de sistemas modelo*

Los sistemas modelo consistentes en distintas proteínas alimentarias (BSA, proteína de soja, caseína y gluten de trigo) y ácido glioxílico se trataron térmicamente en condiciones apropiadas para producir proteínas carboximetiladas, según el procedimiento descrito por Berg et al. (1998) con ligeras modificaciones.

Se prepara una disolución (25 mg/mL) en tampón fosfato salino 0.2M pH 8 de cada una de las proteínas. Se mezclan 2 mL de las disoluciones de las proteínas con 145 µL de ácido glioxílico 0.3 M y 145 µL de cianoborohidruro sódico 0.9 M recién preparado y se incuba a 37°C con agitación constante a 1400 rpm (Thermomixer) durante 0, 5 y 10

minutos, 24 y 48 horas, para conocer la cinética de formación de las diferentes proteínas carboximetiladas. Las mezclas de reacción se almacenan a -20°C hasta el análisis. La carboximetilación se realiza por duplicado.

#### *Hidrólisis ácida*

Los sistemas modelos consistentes en gluten se homogeneizan, antes de la hidrólisis ácida, con un Ultra-Turrax. Las proteínas carboximetiladas (sistemas modelo) se hidrolizan con HCl a una concentración final de 6N, manteniendo la relación 5-6.25 mg proteína/mL de HCl y añadiendo DAP como patrón interno. Para ello, se pipetea 500 µL en un vial de vidrio de 13 mL, y se añade 1 mL de DAP (16 mg/100mL) y 1.5 mL de HCl 12 N. Se agita y se desgasifica con helio durante 2 minutos. Se trata a 110°C durante 24 horas.

Las muestras de alimento se hidrolizan por el procedimiento descrito para los sistemas modelo. Se pesa en un vial de vidrio de 13 mL una cantidad de muestra conteniendo 22 mg de proteína (cuadro 13) y se añaden 2 mL de DAP (16 mg/100 mL) y 2 mL de HCl 12 N. Se agita y se desgasifica con helio durante 2 minutos. Se trata a 110°C durante 24 horas.

Las muestras hidrolizadas se enfrían a temperatura ambiente, se filtran por papel y se mantienen a -20°C hasta su análisis. Se realizan duplicados de hidrólisis.

Cuadro 13. CML. Cantidad de alimento hidrolizado (equivalente a 22 mg de proteína).

	Cantidad (g) de muestra hidrolizada
PCL A	0.647
PCL B (con miel)	0.629
PCL C (con frutas)	0.629
Clara de huevo	0.226
Leche desnatada esterilizada	0.687
Leche condensada	0.367
Leche en polvo	0.088
Leche entera evaporada	0.314
Batido de leche con cacao	0.733
Pan	0.257
Bebida de soja	0.629
Preparado en polvo para elaborar crepes	0.733

### *Derivatización*

Se toman alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  de hidrolizado y se llevan a sequedad en el rotavapor a 38-40°C. Se añaden 165  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida (disolvente) y 15  $\mu\text{L}$  de trietilamina (para equilibrar el pH) y se agita durante 1 minuto. Se adiciona a la mezcla de reacción 100  $\mu\text{L}$  del agente derivatizante MTBSTFA y se calienta a 65-70°C durante 1 hora para formar los correspondientes N-tert-butildimetilsilil (tBDMSi)

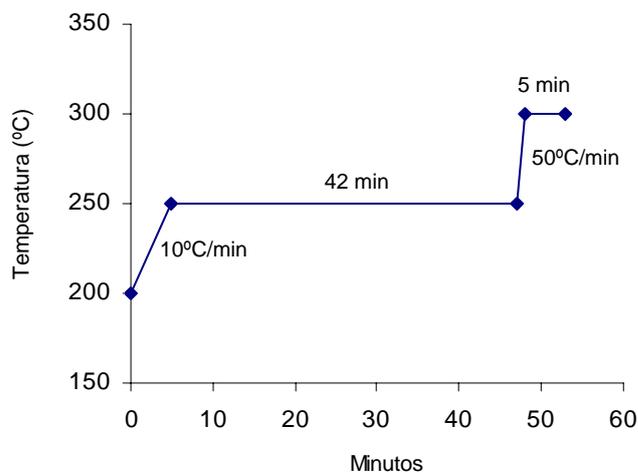
derivados de los aminoácidos. Los tBDMSi derivados se inyectan inmediatamente en la columna para evitar su descomposición.

### 3.4.2. Determinación por CG-FID

Se utiliza el sistema de CG (Hewlett Packard) descrito en el apartado 1.1. de la parte experimental. La separación cromatográfica se lleva a cabo con una columna de sílice fundido CP-SIL 5CB (25m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m) (Chrompack, P.O. Middelburg, Holanda). Se utiliza el N<sub>2</sub> como gas portador a un flujo de 1.2 mL/min. El volumen de inyección es de 3  $\mu$ L sin división de flujos y la temperatura del inyector es de 280°C. El flujo del N<sub>2</sub> en el inyector es de 15.2 mL/min. El programa de temperatura del horno aplicado en la separación de los tBDMSi derivados de los aminoácidos se muestra en la figura 11.

El sistema de detección utilizado es el FID, a una temperatura de 300°C. Los flujos de gases (mL/min) en el detector son: H<sub>2</sub> 35, aire 350 y N<sub>2</sub> 20.

Figura 11. Determinación de CML, lisina y LAL por CG-FID. Programa de calentamiento del horno.



### 3.4.3. Identificación de lisina, LAL y CML

Los picos correspondientes a lisina, LAL, y CML se identifican por comparación con los tiempos de retención relativos obtenidos para estándares puros de estos compuestos y por CG-MS.

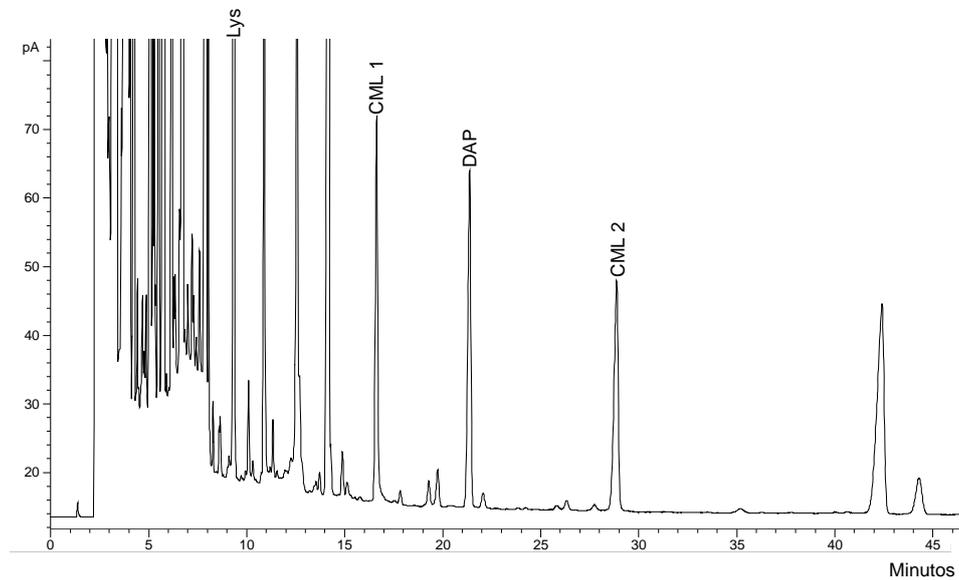
La CML presenta dos picos en el cromatograma, que corresponden a la introducción de tres o cuatro grupos tert-butil-silil en su estructura durante la derivatización, por lo que se utilizan ambos picos para la cuantificación. Hasenkopf et al. (2002) también obtienen dos derivados de CML utilizando MTBSTFA como agente derivatizante de los aminoácidos.

Se obtienen los siguientes tiempos de retención relativos: 0.43, para la lisina, 0.77 y 1.34, respectivamente, para los tri y tetra tert-butil-

silil derivados de la CML (CML1 y CML2) y 2.10 para la LAL. Los derivados y el DAP (patrón interno) muestran una buena separación.

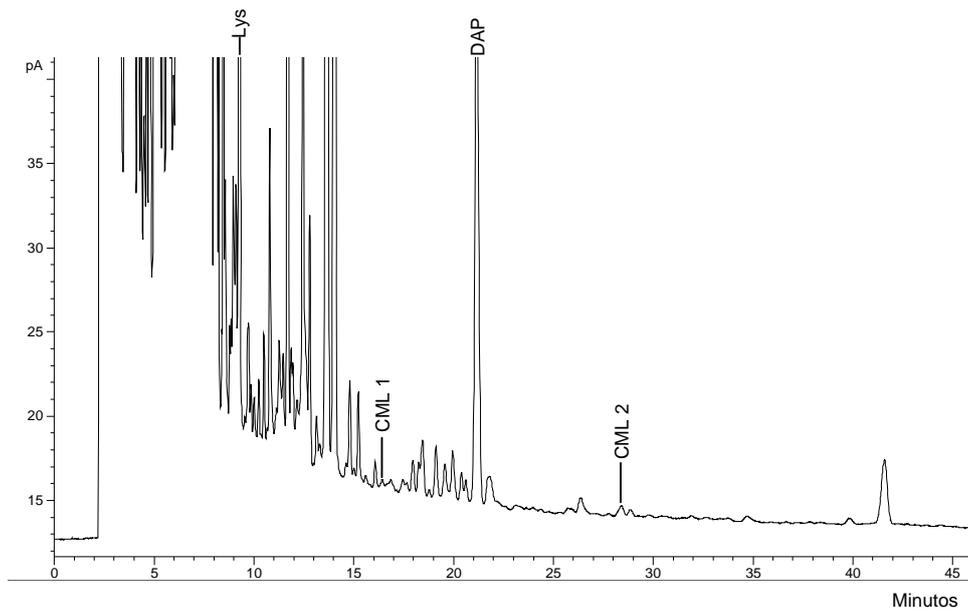
A modo de ejemplo, en las figuras 12 y 13 se muestran, respectivamente, los cromatogramas obtenidos al inyectar en el CG-FID BSA carboximetilada (incubando 24 horas con ácido glioxílico y cianoborohidruro sódico) y papilla B (con miel) almacenada 9 meses a 37°C.

Figura 12. Cromatograma obtenido al inyectar BSA carboximetilada (tiempo de incubación con ácido glioxílico y cianoborohidruro sódico 24 horas) (CG-FID).



CML1= Tri-tert-butil-silil-CML  
CML2= Tetra-tert-butil-silil-CML  
DAP= Ácido 2,6-diaminopimérico (patrón interno)

Figura 13. Cromatograma obtenido al inyectar papilla B (con miel) almacenada 9 meses a 37°C (CG-FID).



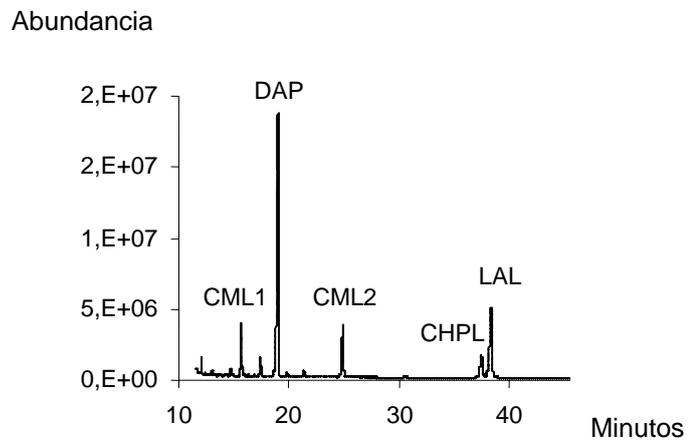
CML1= Tri-tert-butil-silil-CML  
 CML2= Tetra-tert-butil-silil-CML  
 DAP= Ácido 2,6-diaminopimérico (patrón interno)

Los picos identificados como CML y LAL se comprueban con un análisis en el sistema CG-MS (Hewlett Packard) descrito en el apartado 1.1. de la parte experimental. La separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna HP-5MS (30m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m) (Hewlett Packard). Se utiliza el helio como gas portador. El volumen de inyección es de 1  $\mu$ L sin división de flujos y la temperatura del inyector es de 280°C. El gradiente de temperatura consiste en 1 min a 80°C, rampa hasta 200°C a 50°C/min, rampa hasta 250°C a 10°C/min, 42 min a 250°C, rampa hasta 300°C a 50°C/min y 5 min a 300°C. Se utiliza un detector de Espectrometría de Masas (MS) en modo EI a 70 eV.

En la figura 14 se muestra un cromatograma correspondiente a la inyección de patrón de CML y LAL derivatizados con patrón interno (DAP) en el CG-MS, y en las figuras 15 y 16, los espectros de masas obtenidos que han permitido su identificación.

En el análisis se detecta también N<sup>ε</sup>-(1-(carboxi-3-hidroxipropil)-L-lisina) (CHPL) (figura 14 y 17), identificada por vez primera por Hasenkopf et al. (2002) como producto de la RM en proteínas o poli-L-lisina incubada con ácido ascórbico o dehidroascórbico. Estos autores sugieren que podría ser un indicador específico de la ascorbilación de proteínas, dado que su presencia no se detecta en mezclas de proteínas y poli-L-lisina glicadas con ribosa, fructosa, glucosa, lactosa y maltosa. En cambio, en este trabajo, la CHPL se ha detectado en el patrón de CML y también en la BSA, soja, caseína y gluten carboximetiladas (incubadas con ácido glioxílico y cianoborohidruro sódico).

Figura 14. Cromatograma CG-MS de los N-tert-butildimetilsilil derivados de CML y LAL.



CML1= Tri-tert-butil-silil-CML  
CML2= Tetra-tert-butil-silil-CML  
DAP= Ácido 2,6-diaminopimélico (patrón interno)  
CHPL= N<sup>ε</sup>-(1-(carboxi-3-hidroxi-3-propil)-L-lisina)  
LAL=Lisinoalanina

Figura 15. Espectros de masas de los N-tert-butildimetilsilil derivados de CML.

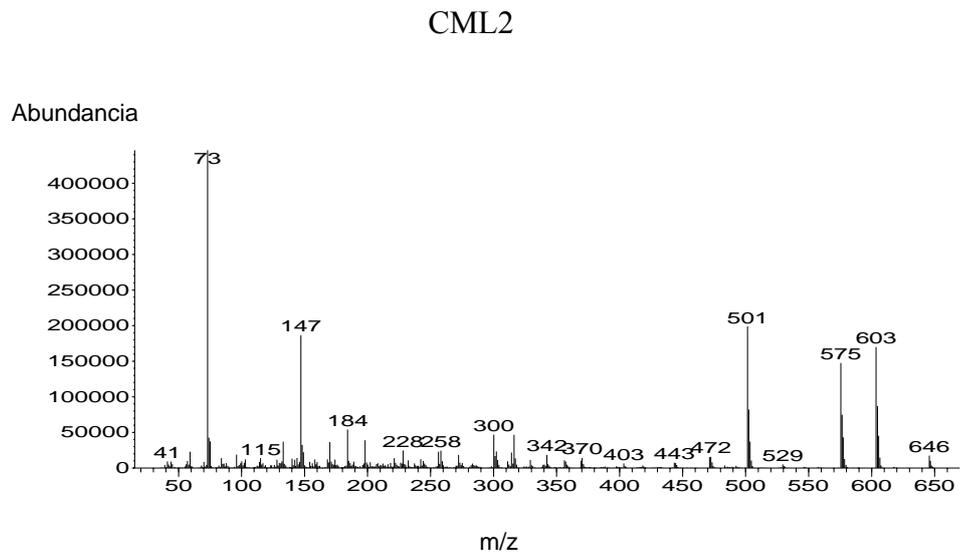
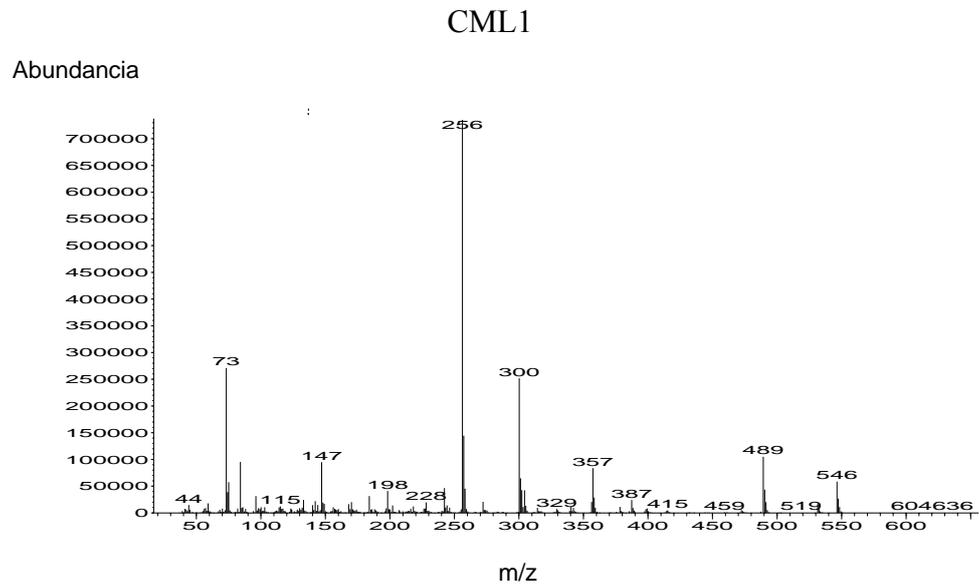


Figura 16. Espectro de masas del N-tert-butildimetilsilil derivado de LAL.

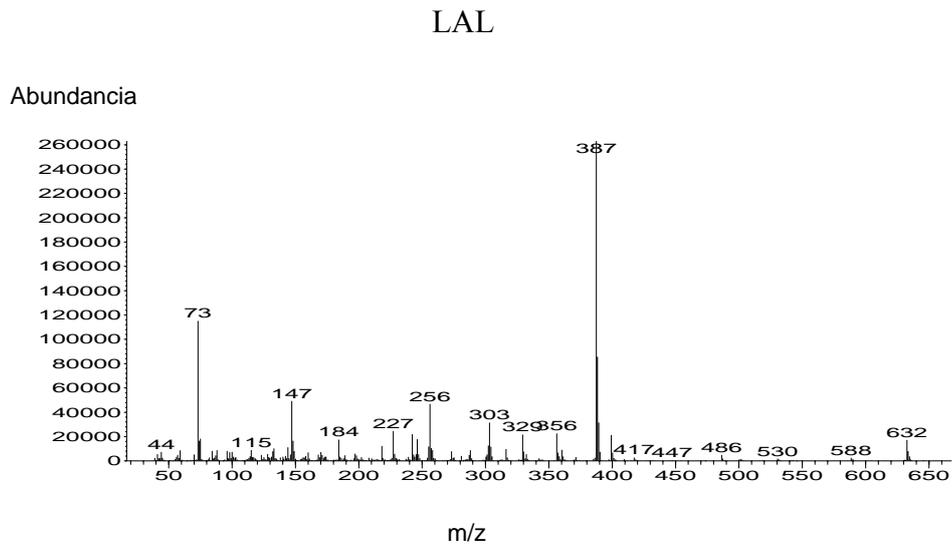
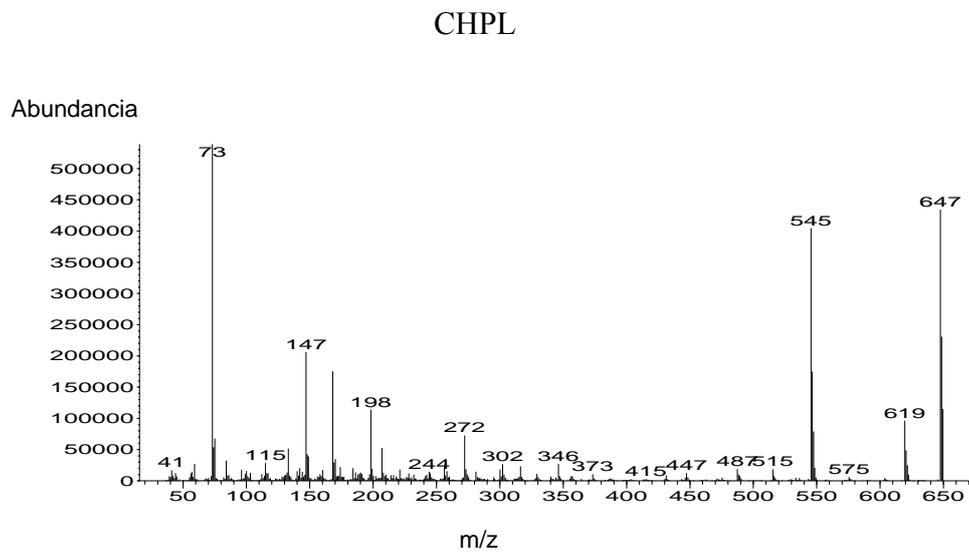


Figura 17. Espectro de masas del N-tert-butildimetilsilil derivado de CHPL.



Los fragmentos más abundantes en el espectro de masas de los N-tert-butildimetilsilil (tBDMSi) derivados son:  $[M-15]^+ -CH_3$ ;  $[M-57]^+ -C(CH_3)_3$ ;  $[M-85]^+ -C(CH_3)_3-CO$ ;  $[M-131]^+ -OtBDMS$ ;  $[M-159]^+ -COOtBDMS$ ;  $[M-131-159]^+ -OtBDMS-COOtBDMS$  (Hasenkopf et al., 2002). Los patrones de fragmentación característicos encontrados para cada uno de los compuestos analizados se muestran en el cuadro 14.

Cuadro 14. Fragmentos principales obtenidos en los MS de los N-tert-butildimetilsilil derivados de CML1, CML2, LAL y CHPL.

	m/z	Fragmento
CML1 (tri-tert-butil-silil-derivado)	256	M-131-159
	300	M-R-2H*
	489	M-57
	546	M
CML2 (tetra-tert-butil-silil-derivado)	300	M-R-2H*
	370	M-131-159
	501	M-159
	575	M-85
	603	M-57
LAL	387	M-131-159-15
	632	M-57
CHPL	545	M-159
	647	M-57

\*El fragmento obtenido se corresponde con la estructura de la lisina biderivatizada (con dos grupos tBDMS) menos un grupo  $-C(CH_3)_3$ .

#### 3.4.4. Cuantificación de lisina, LAL y CML

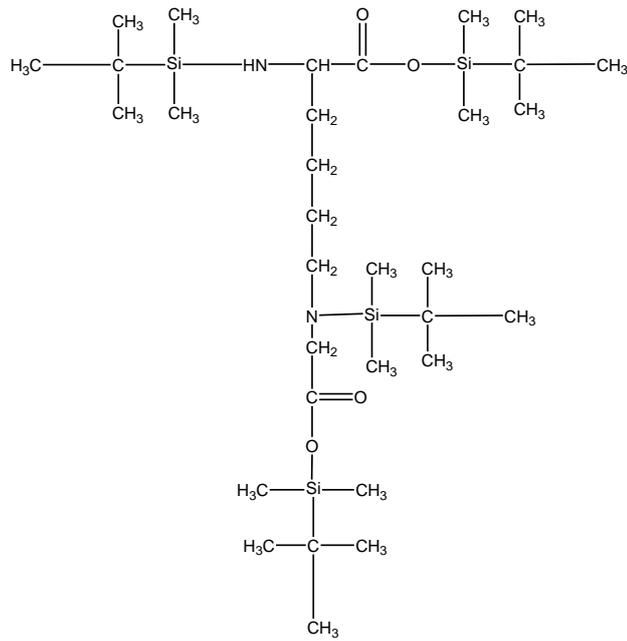
El análisis cuantitativo se lleva a cabo por el método del patrón interno.

El factor de respuesta (F) obtenido para la CML es de  $1.95 \pm 0.18$  (determinado por inyección de CML pura varias veces y en días distintos). Los valores de F utilizados para la cuantificación de LAL y lisina son  $3.62 \pm 0.33$  y  $1.22 \pm 0.04$ , respectivamente. Las diferencias en los factores de respuesta pueden explicarse por las diferencias en la estructura de los derivados formados para cada uno de los aminoácidos (figura 18).

### 3.5. Color

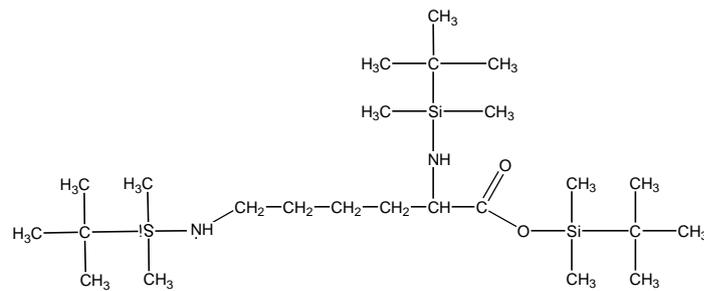
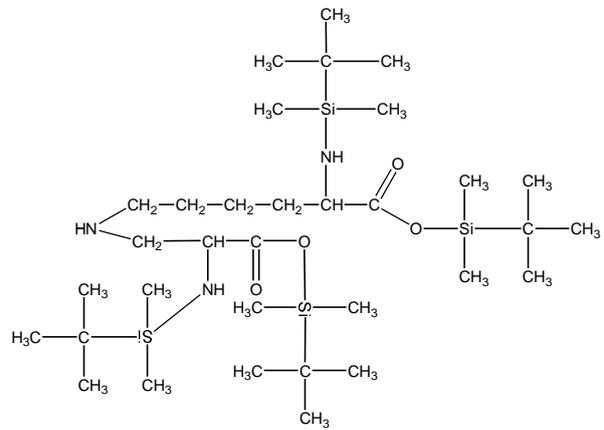
El color se mide utilizando un colorímetro Hunter Labscan II. Los resultados se expresan de acuerdo con el sistema CIELAB con referencia a un iluminante D65 y un ángulo visual de  $10^\circ$ . Los parámetros que se determinan son  $L^*$  (luminosidad o brillo:  $L^*=0$  negro y  $L^*=100$  blanco),  $a^*$  (componente rojo-verde:  $-a^*$  = verde,  $+a^*$  = rojo) y  $b^*$  (componente amarillo-azul:  $-b^*$  = azul,  $+b^*$  = amarillo). La diferencia de color entre dos muestras viene dada por la expresión:  $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$  (Calvo, 2004).

Figura 18. Estructura de la CML, LAL y Lys derivatizadas.



Tetra-tert-butyl-silil-CML

Tetra-tert-butyl-silil-LAL



Tri-tert-butyl-silil-Lys

### 3.6. Análisis estadístico

El estudio estadístico se realiza con el programa Statgraphics plus 3.1 statistical software package.

Para detectar diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de aminoácidos de los tres tipos de PCL analizadas (A, B y C), se aplica un análisis del origen de la varianza (ANOVA) de un factor y un test de Tukey. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.01$ .

Para evaluar la influencia de los tres factores de almacenamiento estudiados, tipo de muestra (A, B y C), temperatura (25°, 30° y 37°C) y período de almacenamiento (0, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 meses), en los contenidos de furosina, compuestos fluorescentes e incremento de color ( $\Delta E$ ), se aplica un ANOVA de tres factores y un test de Tukey para identificar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los niveles de los factores.

Para obtener modelos predictivos del contenido de furosina, compuestos fluorescentes e incremento de color, en función del tiempo de almacenamiento, la temperatura y/o el tipo de muestra, se hacen análisis de regresión múltiple.

Se realizan regresiones simples entre el contenido de furosina (variable independiente, x) y los AGEs o el color (variable dependiente, y) para establecer la relación entre las variables.

Además se realizan correlaciones totales y parciales entre las variables estudiadas. Las correlaciones totales miden la posible relación lineal entre ellas y las correlaciones parciales miden la relación entre las variables sin considerar el posible efecto, en uno u otro sentido, de otras variables estudiadas, por lo que informan de la posible relación causa-efecto.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Optimización y validación de métodos de determinación de compuestos indicadores de la RM

#### 4.1.1. Aminoácidos

##### *Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)*

Se determinan según el método propuesto por Knoll (1985). Para ello, se inyecta un patrón derivatizado que contiene 10 pmol/ $\mu$ L (0.01 mM) de cada uno de los aminoácidos y se mide la altura de los picos correspondientes a cada aminoácido (hs) y la anchura a media altura (Wh). A continuación, se inyecta un blanco y en el cromatograma obtenido se estudia el intervalo de tiempo cuya amplitud sea un múltiplo de 10 de Wh y cuyo centro coincida con el tiempo de retención absoluto del aminoácido problema. De este intervalo estudiado en el cromatograma del blanco interesa la altura del pico máximo (hn).

Para el cálculo de LD y LC se aplican las siguientes expresiones:

$$LD = 1.9718 \cdot hn \cdot Cs/hs$$

$$LC = 5.755 \cdot hn \cdot Cs/hs$$

donde: Cs es la concentración del aminoácido en el patrón; 1.9718, la constante para el cálculo del LD correspondiente a un múltiplo de 10 de Wh; 5.755, la constante para el cálculo del LC correspondiente a un

múltiplo de 10 de Wh; hn, la altura del pico máximo en el intervalo seleccionado del cromatograma del blanco y hs, la altura del pico del aminoácido.

Los LD y LC obtenidos se indican en el cuadro 15. Los valores de LD obtenidos para los aminoácidos sometidos a hidrólisis ácida con o sin oxidación perórmica previa están en el intervalo 0.016-0.367  $\mu\text{M}$  (0.79-20.14 mg/100g muestra) y los valores de LC, entre 0.047-1.073  $\mu\text{M}$  (2.31- 58.89 mg/100g muestra). En la determinación de triptófano, se obtiene un LD de 0.672  $\mu\text{M}$  (0.150 mg/100 g muestra) y un LC de 1.960  $\mu\text{M}$  (0.437 mg /100 g muestra).

La determinación de aminoácidos por CLAR previa derivatización con AQC proporciona LD menores que otros derivatizantes usados con detección UV o de fluorescencia, como el fenilisotiocianato (PITC), empleado en la determinación de aminoácidos en fórmulas para lactantes (9- 190.4 mg/100 g) (Alegría et al., 1996 y 1998) y en pienso, queso, carne y harina de soja (1 pmol) (Bidleingmeyer et al., 1984 y 1987) y el o-ftalaldehido-3-ácido mercaptopropiónico (OPA-3-MPA) y 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC) utilizados en pastel de ternera con soja (0.279-1.368  $\mu\text{M}$ ) (Heems et al., 1998).

Cuadro 15. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) en la determinación de aminoácidos.

Aa	hs	hn	LD	LC
$\mu\text{M}$ en el ensayo				
Asp	321808	1088	0.066	0.194
Ser	385884	1050	0.053	0.156
Glu	359255	1050	0.057	0.168
Gly	325150	760 <sup>a</sup>	0.046	0.134
His	557346	760 <sup>a</sup>	0.026	0.078
Arg	944391	5148	0.107	0.313
Thr	938464	5148	0.108	0.315
Ala	823485	5148	0.123	0.359
Pro	365367	3398	0.183	0.535
Tyr	774765	1253	0.031	0.093
Val	1088418	1029	0.018	0.054
Lys	523794	9766	0.367	1.073
Ile	1061021	9766	0.181	0.529
Leu	926692	760 <sup>a</sup>	0.016	0.047
Phe	924630	760 <sup>a</sup>	0.016	0.047
CysA	288604	760 <sup>a</sup>	0.052	0.151
MetS	1167838	5148	0.087	0.253
Trp	2907	99	0.672	1.960

<sup>a</sup> Se ha tomado como hn la altura del pico de menor tamaño del cromatograma del blanco, porque en el intervalo estudiado no hay picos.

hs: Altura del pico del aminoácido

hn: Altura del pico máximo en el intervalo seleccionado del cromatograma del blanco

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación

Los LD obtenidos están incluidos en el intervalo de valores indicado por otros autores utilizando el mismo derivatizante con detección UV (0.06-0.29 pmol) (Liu, 1994) y de fluorescencia (0.04-0.32 pmol, excepto para Cys 0.8 pmol; Cohen y Michaud, 1993) (menor de 0.05 pmol, excepto Cys menor de 0.6 pmol; Hernández-Orte et al., 2003). En el caso de los aminoácidos Arg, Thr, Ala, Pro y Lys, se obtienen LD más elevados que los mencionados en los trabajos previos indicados anteriormente, pero adecuados para la determinación de aminoácidos en las PCL.

### *Linealidad*

Se determina a partir del análisis de patrones de aminoácidos de distinta concentración (0.0025, 0.005, 0.03, 0.05, 0.1 y 0.2 mM) con patrón interno añadido 0.1 mM. En el caso del triptófano, se utilizan patrones de 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 y 0.8 mM. Se realiza la regresión lineal de la respuesta (medida como la relación de áreas del aminoácido y del patrón interno) frente a la concentración de cada aminoácido. Las pendientes de las regresiones lineales y los coeficientes de correlación obtenidos se muestran en el cuadro 16. Los coeficientes de correlación fueron superiores a 0.992, excepto en el caso del ácido glutámico (0.987), la arginina (0.986), la valina (0.975) y la metionina sulfona (0.949), valores que también son aceptables.

El intervalo de linealidad obtenido permite determinar contenidos de aminoácidos menores que con otros derivatizantes, como el PITC (concentración inferior del intervalo 0.02 mM) (Bidlingmeyer et al., 1984 y 1987) y OPA-3-MPA-FMOC (concentración inferior 0.003 mM)

(Heems et al., 1998), y es 10 veces menor que el citado para el mismo método por Liu (1994) con detección UV (0.025-0.5 mM) y por Cohen y Michaud (1993) con detección de fluorescencia (0.025-0.2 mM).

#### *Interferencias de la matriz*

Se estudian por el método de las adiciones añadiendo muestra hidrolizada al patrón de aminoácidos. Se comparan las pendientes de las regresiones lineales obtenidas al inyectar patrones de aminoácidos de las concentraciones estudiadas en la linealidad con las obtenidas al inyectar los mismos patrones añadidos de hidrolizado de la muestra. No existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre las pendientes de las ecuaciones de regresión correspondientes a patrón sólo y adicionado de matriz (cuadro 16). Por lo tanto, se concluye que en la determinación de aminoácidos en PCL no hay interferencias de la matriz.

Cuadro 16. Estudio del efecto de la matriz (método de adición) en la determinación de aminoácidos.

Aa	Intervalo de confianza de la pendiente (patrón)*	r	Intervalo de confianza de la pendiente (patrón adicionado de matriz)*	r
Asp	25.46-36.00	0.992	27.05-31.03	0.999
Ser	31.98-45.38	0.992	35.12-39.95	0.999
Glu	25.42-40.44	0.987	29.44-37.13	0.996
Gly	29.27-40.39	0.993	32.32-34.83	1.000
His	50.03-65.56	0.995	49.96-56.57	0.999
Arg	37.15-59.79	0.986	42.01-51.47	0.997
Thr	57.77-72.72	0.997	53.38-64.82	0.997
Ala	51.67-64.66	0.997	49.87-56.35	0.999
Pro	27.29-31.37	0.999	22.78-28.30	0.997
Tyr	49.02-64.49	0.995	51.39-55.13	1.000
Val	49.76-96.20	0.975	88.84-95.77	1.000
Lys	43.44-55.89	0.996	41.46-49.25	0.998
Ileu	105.12-131.80	0.997	102.23-115.76	0.999
Leu	100.99-124.20	0.997	93.47-111.12	0.998
Phe	121.19-152.48	0.997	119.93-133.90	0.999
CysA	38.43-39.94	1.000	35.41-40.37	0.999
MetS	36.75-99.98	0.949	30.12-98.42	0.934
Trp	5058076.02-5883599.57	0.999	5613597.24-6401347.57	0.999

r: coeficiente de correlación

\* Si los intervalos de confianza de las pendientes se superponen no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

### *Precisión*

La precisión instrumental, de la derivatización y del método, expresada como coeficiente de variación, se muestra en el cuadro 17. La precisión instrumental se calcula a partir de tres inyecciones de un patrón derivatizado 0.01 mM, o en el caso del triptófano de un patrón 0.2 mM, obteniéndose coeficientes de variación de 0.04-0.9%. La precisión del procedimiento de derivatización se calcula a partir de inyecciones de un patrón derivatizado ocho veces en tres días distintos (interdía 0.6- 2.9%) y tres veces en un mismo día (intradía 0.2- 2.7%). La precisión del método se estima aplicando el procedimiento de determinación de aminoácidos (apartado 3.1.1-3.1.3 de la parte experimental) a tres alícuotas de muestra de papilla B, y se obtienen coeficientes de variación de 0.2 a 4.2% (excepto para MetS 6.7%).

La precisión es similar a la obtenida por otros autores, independientemente del derivatizante y de la matriz analizada (Bidlemeier et al., 1984 y 1987; Sarwar et al., 1988; Cubedo, 1990; Cohen and De Antonis, 1994; Strydom and Cohen, 1994; Liu et al., 1995; Alegría et al., 1996 y 1998; Heems et al., 1998; Montaña et al., 2004).

Cuadro 17. Precisión expresada como coeficiente de variación en la determinación de aminoácidos.

Aa	Instrumental <sup>1</sup>	Derivatización <sup>1</sup>		Método (n=3) <sup>2</sup>
		Intradía (n=3)	Interdía (n=8)	
Asp	0.7	0.8	0.8	1.6
Ser	0.6	1.0	1.4	3.1
Glu	0.4	0.5	0.6	0.2
Gly	0.2	0.5	1.8	3.3
His	0.7	0.2	1.0	2.3
Arg	0.2	0.2	2.4	1.8
Thr	0.8	0.6	2.7	3.0
Ala	0.6	0.3	1.6	2.4
Pro	0.9	1.5	2.9	1.0
Tyr	0.8	1.0	0.8	3.5
Val	0.7	0.5	0.6	2.8
Lys	0.8	2.7	1.8	1.2
Ile	0.7	0.5	1.6	1.9
Leu	0.9	0.4	1.1	1.9
Phe	0.8	0.4	1.0	1.9
CysA	0.7	1.2	2.3	3.4
MetS	0.04	1.3	1.8	6.7
Trp	0.3	–	–	4.2

<sup>1</sup> Estimado con patrones

<sup>2</sup> Estimado con PCL

*Exactitud*

Los aminoácidos libres se oxidan durante la hidrólisis ácida, por lo tanto, sólo se evalúa la exactitud de la etapa de derivatización y/o determinación cromatográfica (caso del triptófano) mediante ensayos de recuperación. Se adicionan cantidades conocidas de patrón de aminoácidos (una o dos veces el contenido en la muestra) al hidrolizado de la muestra (papilla B). El porcentaje de recuperación se calcula como:

$$\% \text{ Recuperación} = ((X-Y) \cdot 100) / Z$$

X e Y = Contenido medio del aminoácido en las muestras adicionadas y sin adicionar, respectivamente

Z = Concentración de aminoácido añadido a las muestras

Los ensayos se realizan por triplicado. Los valores de % de recuperación obtenidos oscilan entre 86 y 109% (cuadro 18).

Cuadro 18. Exactitud de la derivatización y/o determinación cromatográfica de los aminoácidos de las PCL.

Aa	Presente mg/100g (n=3)	Añadido mg/100g	Hallado mg/100g (n=3)	Recuperación %
<i>Asp</i>	254±4	597	860±9	101.5±1.5
<i>Ser</i>	193±6	470	673±6	102.1±1.3
<i>Glu</i>	835±2	662	1536±15	105.9±2.3
<i>Gly</i>	94±3	339	432±6	99.7±1.8
<i>His</i>	99±2	723	831±18	101.3±2.5
<i>Arg</i>	147±3	796	966±17	102.9±2.2
<i>Thr</i>	150±4	561	685±13	95.3±2.3
<i>Ala</i>	126±3	410	517±1	95.3±0.4
<i>Pro</i>	340±3	481	843±7	104.5±1.5
<i>Tyr</i>	128±4	825	934±15	97.8±1.8
<i>Val</i>	206±6	478	617±50	86.0±10.4
<i>Lys</i>	241±3	662	914±16	101.6±2.4
<i>Ile</i>	167±3	555	696±40	95.4±7.3
<i>Leu</i>	318±6	569	832±53	90.2±9.3
<i>Phe</i>	171±3	717	884±37	99.4±5.2
<i>CysA</i>	51±2	122	173±7	99.7±5.5
<i>MetS</i>	80±5	131	211±19	99.7±14.3
<i>Trp</i> <sup>1</sup>	27±2	45	77±1	108.7±0.7

<sup>1</sup> Sin derivatización previa

n: Número de réplicas

No se dispone de un material de referencia similar a las PCL, por lo que la exactitud del método se evalúa con ensayos de recuperación adicionando, antes de la hidrólisis, una proteína (caseína) a las PCL. Se selecciona la caseína por ser la proteína principal de la leche, componente mayoritario en las muestras estudiadas (88%). Se adiciona una cantidad de caseína similar a la presente en la cantidad de muestra (papilla B) tomada para la hidrólisis. El ensayo se realiza por triplicado. Los porcentajes de recuperación obtenidos oscilan entre 88.3 y 118.2%, (cuadro 19), excepto para la cisteína (55.3%). Esto se debe a que el contenido de cisteína en la caseína añadida es cuatro veces menor que el correspondiente a la muestra, donde los cereales aportan también parte de ella.

Cuadro 19. Exactitud del método de determinación de los aminoácidos estimada con ensayos de recuperación con caseína añadida.

Aa	Presente mg/100g (n=3)	Añadido mg/100g	Hallado mg/100g (n=3)	Recuperación %
<i>Asp</i>	254±4	277	557±28	109.0±10.1
<i>Ser</i>	193±6	184	396±23	110.1±12.7
<i>Glu</i>	835±2	835	1775±69	112.6±8.3
<i>Gly</i>	94±3	64	170±8	118.2±13.6
<i>His</i>	99±2	100	214±12	115.5±12.3
<i>Arg</i>	147±3	226	422±62	107.1±17.4
<i>Thr</i>	150±4	187	315±13	88.5±7.0
<i>Ala</i>	126±3	121	251±12	102.8±9.5
<i>Pro</i>	340±3	429	757±27	97.0±6.3
<i>Tyr</i>	128±4	116	259±16	108.0±6.8
<i>Val</i>	206±6	266	441±5	88.3±1.8
<i>Lys</i>	241±3	305	580±30	110.9±9.7
<i>Ile</i>	167±3	198	385±17	110.2±8.5
<i>Leu</i>	318±6	369	649±7	89.5±1.9
<i>Phe</i>	171±3	172	371±17	115.9±9.7
<i>CysA</i>	51±2	15	58±1	55.3±2.2
<i>MetS</i>	80±5	147	227±10	100.4±6.8
<i>Trp</i>	27±2	45	72±2	100.5±3.6

n: Número de réplicas

#### 4.1.2. Compuestos fluorescentes

Con el fin de seleccionar la cantidad de enzima y el tiempo de incubación (25°C) necesarios para la liberación completa de los compuestos unidos a proteínas en la determinación de compuestos totales, se realizan ensayos, tomando como punto de partida las condiciones utilizadas por Ferrer et al. (2005b) en un trabajo previo en fórmulas para lactantes.

##### *Cantidad de enzima*

Se ensayan distintas cantidades de pronasa (8, 16, 20, 24, 32 y 40 U) adicionadas a la muestra de papilla B siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3. de la parte experimental, excepto el tiempo de incubación que se prolonga a 24 horas para asegurar que la hidrólisis enzimática sea completa, y se determinan los AGEs y la pentodil-lisina totales. Cada cantidad de enzima se ensaya por triplicado. Los resultados muestran que la cantidad de enzima que debe utilizarse es 24 U, porque los % IF que se obtienen no difieren significativamente ( $p > 0.05$ ) de aquellos obtenidos con cantidades de enzima mayores.

La cantidad de pronasa seleccionada es mayor que la usada en fórmulas para lactantes por Ferrer et al. (2005b), pero la relación entre compuestos totales y libres es también mayor en PCL (de 8 a 10) que en fórmulas para lactantes (de 4 a 5).

### *Tiempo de incubación*

Se utiliza una cantidad de pronasa fija (24 U) y se ensaya un intervalo de tiempos de incubación (30, 60, 90 y 120 minutos). No se encuentran diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tiempos ensayados, por lo que se selecciona el más corto (30 minutos).

#### 4.1.3. CML

##### *Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)*

El LD se determina mediante inyección de patrón de CML con DAP y tomando el valor del área del pico mayor, debido al ruido de la señal de detección en la vecindad de los picos de la CML, multiplicado por 3. El LC se calcula del mismo modo multiplicando por 10. Se obtienen los siguientes valores: 3.61 nmoles (2.63 mg/L o 13  $\mu$ M en el derivatizado; 3.35 mg/100 g proteína) y 12.02 nmoles (8.77 mg/L o 43  $\mu$ M en el derivatizado; 11.16 mg/100 g proteína), para el LD y LC, respectivamente.

Los LD y LC que proporciona el método de determinación de CML por CG-FID son mayores que los obtenidos por otros autores utilizando distintas técnicas (cuadro 20).

Cuadro 20. LD, precisión y exactitud (% de recuperación) obtenida por otros autores para la determinación de CML utilizando distintas técnicas.

Muestra	Técnica/ Derivatizante	LD ( $\mu\text{M}$ )	Precisión (CV%)	Recuperación (%)	Autores
Leche UHT	CLAR/ OPA	0.98	–	–	Hewedy et al., 1994
Productos lácteos	CLAR/ OPA	0.025 0.055 <sup>a</sup>	2.2	–	Drusch et al., 1999
Albúmina humana sérica glicada	CLAR/ AQC	12.10 <sup>-6b</sup>	5-9	93	Ahmed et al., 2002
Proteínas plasmáticas, plasma y orina	CL-MS/MS	85.10 <sup>-9b</sup>	6	101	Thornalley et al., 2003
Leche pasteurizada, UHT y en polvo	ELISA	0.049-0.49	–	–	Tauer et al., 1999
Fórmulas para lactantes	ELISA	–	< 4-5	–	Birlouez-Aragon et al., 2005
Leche, fórmulas para lactantes y orina	ELISA	–	4-5	–	Dittrich et al., 2006
Orina	CG-MS/ Etilcloroformato	0.1	0.6-4.6	89	Petrovic et al., 2005
Fórmulas para lactantes, galletas, salmón y ternera	CG-MS/ metanol-ácido trifluoroacético	0.07 0.73 <sup>a</sup>	5	–	Charissou et al., 2007

<sup>a</sup> LC<sup>b</sup> Datos expresados en  $\mu\text{mol}$

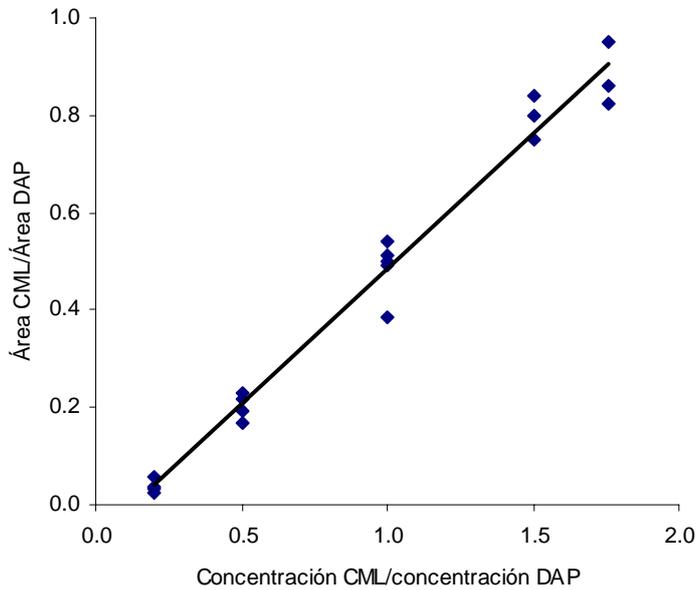
### *Linealidad*

Se determina a partir del análisis de patrones de CML de distinta concentración (52, 130, 261, 391 y 460  $\mu\text{M}$ ) con patrón interno (DAP) añadido (261  $\mu\text{M}$ ). Se realiza la regresión lineal entre la respuesta (medida como áreas de los picos de la CML y el patrón interno) y la relación entre las concentraciones de CML y de patrón interno. La ecuación obtenida a partir de la regresión lineal y el coeficiente de correlación son:  $y = 0.557x - 0.072$  ( $r=0.981$ ). La representación gráfica se muestra en la figura 19.

El intervalo de linealidad obtenido por Drusch et al. (1999) en la determinación de CML por CLAR previa derivatización con o-ftaladehído (OPA) es menor (16.5-67.5  $\mu\text{M}$ ) al obtenido en este trabajo, al igual que el indicado por Petrovic et al. (2005) (0.5-25  $\mu\text{M}$ ) utilizando CG-MS previa derivatización con etilcloroformato y por Charissou et al. (2007) (1.2-97.9  $\mu\text{M}$ ) utilizando CG-MS previa derivatización con metanol en medio ácido y ácido trifluoroacético anhidro.

Aunque el método de determinación por CG-FID proporciona unos LD y LC superiores a los obtenidos por otras técnicas y el intervalo de linealidad se establece para mayores concentraciones de CML, es suficientemente sensible para utilizarlo como indicador en alimentos y ofrece la ventaja de permitir la evaluación de la calidad proteica a partir de la determinación conjunta de CML, LAL y lisina.

Figura 19. Relación entre la respuesta (medida como áreas de los picos) y la concentración de CML.



#### *Precisión del método*

Se estima aplicando el procedimiento descrito en el apartado 3.4. de la parte experimental, al menos por duplicado, a alícuotas de diferentes tipos de muestras de alimentos (apartado 2.2. de la parte experimental). Los coeficientes de variación oscilan entre el 1.6%, obtenido en la bebida de soja de tipo 2, y el 10.0%, obtenido en las PCL A y B (con miel) almacenadas a 37°C durante 9 meses y en la bebida de soja de tipo 1.

Otros autores han obtenido una precisión similar utilizando distintas técnicas (cuadro 20).

### *Exactitud*

Se evalúa la exactitud de la etapa de derivatización y determinación cromatográfica mediante ensayos de recuperación. Cantidades conocidas de patrón de CML (0.027 mg y 0.088 mg) se adicionan a un hidrolizado de muestra de leche UHT y a otro de bebida de soja. Se determina la CML de las muestras adicionadas o no y se calcula el porcentaje de recuperación. Los ensayos se realizan por duplicado.

El porcentaje medio de recuperación obtenido en el caso de la leche UHT es de  $84.45 \pm 1.74$  %, y en el caso de la bebida de soja es de  $107.76 \pm 10.24$  %. La exactitud es similar a la obtenida por otros métodos (cuadro 20).

## **4.2. Aminoácidos en PCL**

### 4.2.1. Contenidos

Los contenidos de aminoácidos de las PCL analizadas, expresados en mg/g proteína, se muestran en el cuadro 21. Los valores corresponden a la media de tres lotes diferentes, analizados por cuadruplicado.

En los tres tipos de papilla, los aminoácidos más abundantes son el ácido glutámico, la prolina y la leucina, mientras que los menores contenidos corresponden a triptófano y cisteína (figura 20).

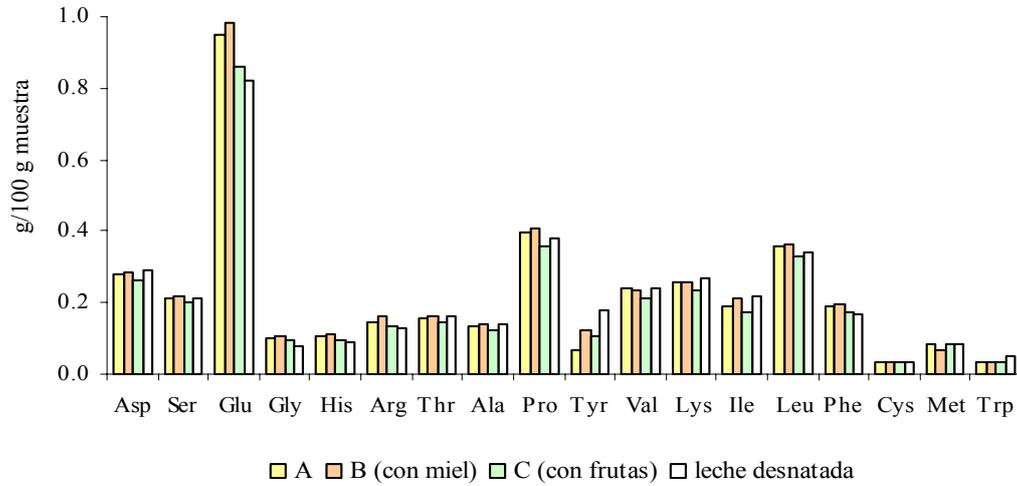
Los tres tipos de papilla presentan un perfil aminoacídico similar al de la leche desnatada (Souci et al., 2000), principal componente de las papillas (88%) (figura 20).

Cuadro 21. Contenido de aminoácidos (mg/g proteína), expresado como media  $\pm$  desviación estándar, en las tres PCL (A, B y C) analizadas.

	A	B (con miel)	C (con frutas)
Asp	81.3 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	81.1 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	75.3 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>
Ser	62.8 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	61.8 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	57.0 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>
Glu	278.8 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	280.6 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>	246.1 $\pm$ 16.6 <sup>b</sup>
Gly	29.2 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	30.7 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	26.4 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
His	30.8 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	31.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	27.5 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
Arg	42.7 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	46.0 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	37.8 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
Thr	45.7 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	46.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	41.6 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
Ala	39.5 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	40.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	35.7 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
Pro	116.5 $\pm$ 5.1 <sup>ab</sup>	117.1 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	101.4 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>
Tyr	19.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	35.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	30.3 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>
Val	70.2 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	67.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	60.2 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>
Lys	76.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	73.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	67.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
Ile	56.4 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	60.4 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	49.6 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>
Leu	104.9 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	103.2 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	94.0 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>
Phe	55.7 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	55.1 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	49.2 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>
Cys	10.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	10.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	10.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Met	24.9 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	18.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	24.3 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
Trp	10.0 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	9.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>

Los valores de una misma fila con algún superíndice coincidente no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.01$ ).

Figura 20. Perfil aminoacídico de las PCL analizadas (A, B y C) y de la leche.



El ANOVA aplicado al contenido de aminoácidos muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre los contenidos de aminoácidos de las muestras analizadas (cuadro 21). Se encuentran diferencias entre las papillas con miel (B) y con frutas (C) para la mayoría de los aminoácidos, entre las que caben destacar las diferencias entre los contenidos de aminoácidos esenciales histidina, treonina, valina, isoleucina, fenilalanina y metionina. En cambio, no existen diferencias entre los aminoácidos esenciales lisina, leucina y triptófano.

Una ración de papilla (250 mL) contribuye de forma significativa al cumplimiento de las RDA de aminoácidos esenciales y semiesenciales propuestas por el FNB (2005) para lactantes (7-12 meses) y niños de corta

edad (1-3 años), como se muestra en el cuadro 22. Para estimar la contribución en aminoácidos de una ración de papilla, se consideran pesos medios de 9 y 12 kg, para lactantes y niños de corta edad, respectivamente (FNB, 2005). Las cantidades de aminoácidos esenciales y semiesenciales que proporciona una ración de papilla son superiores a los requerimientos diarios establecidos para niños de 1-3 años, excepto para el triptófano y la metionina+cisteína. Las contribuciones son inferiores a las recomendadas para lactantes de 7-12 meses en el caso de algunos aminoácidos, siendo el triptófano el aminoácido para el que menos se cumple el requerimiento. Sin embargo, la dieta diaria de un lactante puede incluir, según la edad, 1.5-2 raciones de papilla, además de otros alimentos. De este modo, se satisfacen completamente las RDA (Belitz y Grosch, 1992; Martínez y Hernández, 1993).

#### 4.2.2. Calidad proteica

Para evaluar la calidad proteica de las PCL analizadas, se calcula el índice químico. La proteína de referencia a utilizar para el cálculo de este índice en PCL es la caseína (ESPGAN, 1981; Directiva 2006/125/CE). Según este criterio, la tirosina determina el índice químico de las PCL A y C (con fruta), y el triptófano de la PCL con miel (B) (cuadro 23). Los valores obtenidos son inferiores al 70% recomendado por ESPGAN y al 80% establecido por la Directiva 2006/125/CE, aunque en esta última el porcentaje se refiere a la proteína añadida (leche, en este caso) y en la estimación realizada se toma la proteína de todo el producto (PCL).

Cuadro 22. Porcentajes de cumplimiento de las RDA para aminoácidos esenciales y semiesenciales proporcionados por una ración (250 mL) de PCL de tipo A, B (con miel) y C (con frutas).

	A	B	C	A	B	C
	7-12 meses			1-3 años		
His	98	103	90	112	117	103
Thr	95	98	89	109	113	102
Val	123	123	109	145	144	128
Lys	87	87	80	100	100	92
Ile	134	147	121	154	170	139
Leu	115	116	106	127	129	117
Phe+Tyr	92	113	99	107	132	116
Met+Cys	84	71	84	97	82	97
Trp	78	78	71	96	96	87

El índice químico también se calcula utilizando la proteína patrón de referencia (*amino acid scoring pattern*) propuesta por la FAO/ OMS (1985) para niños de 0-1 año y 2-5 años. En las tres papillas y para los dos grupos de edad considerados, el índice químico (*amino acid score*) viene dado por el triptófano (cuadro 23).

Cuadro 23. Índice químico y aminoácido limitante considerando como proteína de referencia la caseína (ESPGAN, 1981; Directiva 2006/125/CE) o la proteína patrón propuesta por la FAO/OMS (1985).

PCL	ESPGAN (1981) Directiva 2006/125/CE	FAO/OMS (1985)	
		0-1 año	2-5 años
A	34.0 Tyr	58.8 Trp	90.9 Trp
B (con miel)	60.7 Trp	57.1 Trp	88.3 Trp
C (con fruta)	52.2 Tyr	52.1 Trp	80.5 Trp

Los estudios relativos al índice químico de las PCL son escasos. Además, estos productos tienen contenidos de leche variables y en muchos casos no especificados, lo que dificulta la comparación de los datos bibliográficos con los resultados obtenidos.

Constituye otra dificultad el hecho que el índice químico de las papillas también se calcule en relación a proteínas de referencia distintas a la propuesta por la FAO/OMS (1985). Blatná et al. (1983), utilizando proteína de huevo, encuentran que los aminoácidos azufrados (Met y Cys) son los limitantes en PCL; mientras que para Dodd y Ratanani (1988) son la treonina y la lisina, al tomar como referencia los niveles recomendados por la FAO/OMS (1970), y los aminoácidos azufrados y la lisina, al considerar la leche humana como patrón.

Otros autores que utilizan como referencia los valores propuestos por la FAO/OMS (1985) señalan la lisina como aminoácido limitante en alimentos infantiles de destete. Pellett y Mathew (1986) obtienen índices químicos de 57- 61 y de 83- 88, respectivamente, en alimentos a base de mijo y leche desnatada en polvo y a base de arroz y leche desnatada en polvo. Se desconoce el contenido de leche de dichas papillas, pero probablemente sea bajo, porque la lisina, aminoácido limitante de los cereales, determina el índice químico. Suhasini y Malleshi (2003) determinan los aminoácidos, excepto triptófano y tirosina, en alimentos infantiles a base de trigo y garbanzos con leche desnatada en polvo (5%), y también encuentran que la lisina es el aminoácido limitante. Sin embargo, Jirapa et al. (2001) indican que la metionina y cisteína determinan el índice químico (48- 49) de alimentos infantiles con cereales, fruta y un 15% de leche desnatada en polvo. Estos resultados ponen de manifiesto que el contenido de leche de las papillas puede modificar el aminoácido limitante.

En estudios previos en fórmulas para lactantes, el triptófano o los aminoácidos azufrados resultaron ser los limitantes (Pompei et al. 1987; Sarwar et al. 1989; Alegría et al., 1999; Viadel et al., 2000).

En todos los estudios realizados, incluyendo este trabajo, los aminoácidos limitantes son la lisina, los aminoácidos azufrados, la treonina o el triptófano, que coinciden con los citados por la FAO/OMS (1985) como aquellos que suelen limitar la calidad proteica de la dieta humana.

### 4.3. Influencia del almacenamiento en la evolución de la RM en PCL

#### 4.3.1. Furosina

Los contenidos de furosina (expresados en mg/ g de proteína) de las tres PCL analizadas, almacenadas durante 9 meses a 25, 30 y 37°C, se muestran en el cuadro 24. Los análisis se realizan por cuadruplicado. En las muestras recién fabricadas el contenido de furosina oscila entre 3.10 y 3.40 mg/g proteína, y en el último mes de almacenamiento entre 4.26 y 6.03 mg/g proteína.

Los contenidos medios de furosina, independientemente de la temperatura y el tiempo de almacenamiento, son de 3.73, 4.18 y 3.71 mg/g proteína en las muestras A, B y C, respectivamente.

Puesto que la leche es el principal componente (88%) de las papillas estudiadas, la furosina procederá principalmente de la reacción entre las proteínas lácteas y la lactosa; aunque el tipo y la cantidad de cereales (8.8%), sometidos a un tostado previo, incrementará el contenido final de furosina. La hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa, al incrementar el contenido de azúcares reductores, también favorece el desarrollo de la RM (Guerra-Hernández et al., 1999).

Cuadro 24. Contenidos de furosina (mg/g proteína) de las PCL analizadas.

PCL	Mes	25°C	30°C	37°C
A	0		3.10±0.20 <sup>a</sup>	
	1	2.74±0.06 <sup>b</sup>	2.65±0.06 <sup>b</sup>	2.76±0.03 <sup>b</sup>
	2	2.53±0.15 <sup>a,b</sup>	2.73±0.12 <sup>a,b</sup>	3.11±0.04 <sup>a,b</sup>
	4	3.40±0.15 <sup>c,d</sup>	4.02±0.14 <sup>c,d</sup>	4.39±0.05 <sup>c,d</sup>
	5	2.85±0.14 <sup>c</sup>	3.22±0.18 <sup>c</sup>	3.65±0.03 <sup>c</sup>
	6	3.73±0.20 <sup>c,d</sup>	4.22±0.29 <sup>c,d</sup>	4.71±0.20 <sup>c,d</sup>
	7	3.37±0.21 <sup>d</sup>	4.21±0.16 <sup>d</sup>	4.23±0.11 <sup>d</sup>
	8	4.03±0.13 <sup>e</sup>	4.98±0.14 <sup>e</sup>	5.30±0.27 <sup>e</sup>
	9	4.26±0.10 <sup>f</sup>	5.00±0.07 <sup>f</sup>	5.33±0.35 <sup>f</sup>
	B (con miel)	0		3.40±0.18 <sup>a</sup>
1		3.64±0.05 <sup>b</sup>	3.48±0.12 <sup>b</sup>	3.50±0.16 <sup>b</sup>
2		3.33±0.13 <sup>a,b</sup>	3.57±0.25 <sup>a,b</sup>	3.86±0.16 <sup>a,b</sup>
4		3.51±0.07 <sup>c,d</sup>	4.23±0.14 <sup>c,d</sup>	4.37±0.21 <sup>c,d</sup>
5		3.58±0.19 <sup>c</sup>	4.36±0.12 <sup>c</sup>	4.68±0.17 <sup>c</sup>
6		3.55±0.25 <sup>c,d</sup>	4.23±0.24 <sup>c,d</sup>	4.27±0.13 <sup>c,d</sup>
7		3.55±0.06 <sup>d</sup>	4.24±0.26 <sup>d</sup>	4.50±0.13 <sup>d</sup>
8		4.46±0.24 <sup>e</sup>	5.17±0.20 <sup>e</sup>	5.59±0.16 <sup>e</sup>
9		5.28±0.30 <sup>f</sup>	5.75±0.21 <sup>f</sup>	6.03±0.40 <sup>f</sup>
C (con frutas)		0		3.11±0.11 <sup>a</sup>
	1	2.51±0.08 <sup>b</sup>	2.45±0.09 <sup>b</sup>	2.91±0.12 <sup>b</sup>
	2	2.87±0.04 <sup>a,b</sup>	2.98±0.15 <sup>a,b</sup>	3.11±0.18 <sup>a,b</sup>
	4	3.25±0.19 <sup>c,d</sup>	3.76±0.23 <sup>c,d</sup>	4.33±0.19 <sup>c,d</sup>
	5	4.06±0.17 <sup>c</sup>	4.05±0.18 <sup>c</sup>	3.98±0.23 <sup>c</sup>
	6	3.25±0.18 <sup>c,d</sup>	3.54±0.19 <sup>c,d</sup>	3.56±0.13 <sup>c,d</sup>
	7	3.47±0.20 <sup>d</sup>	4.53±0.16 <sup>d</sup>	4.52±0.05 <sup>d</sup>
	8	3.90±0.30 <sup>e</sup>	4.63±0.11 <sup>e</sup>	4.82±0.13 <sup>e</sup>
	9	4.56±0.12 <sup>f</sup>	4.80±0.18 <sup>f</sup>	4.98±0.12 <sup>f</sup>

Superíndices distintos para los valores de una misma columna dentro de cada tipo de papilla indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

Los contenidos de furosina de la muestra B (con miel) son significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores que los de las muestras A y C. Los tres tipos de papillas tienen un contenido proteico similar, han sufrido los mismos tratamientos térmicos, y contienen leche de la misma calidad y en la misma proporción (ver apartado 2.1.1. de la parte experimental). Por lo tanto, la mayor concentración de furosina de la muestra B podría atribuirse al mayor contenido de monosacáridos, que pueden incrementar la susceptibilidad a la RM. La miel presente en esta muestra aumenta los contenidos de fructosa y glucosa en 0.35 y 0.3 g/100g papilla, respectivamente [estimación realizada considerando el porcentaje de miel presente (0.9%) y su contenido de glucosa y fructosa (Souci et al., 2000)]. El efecto de la miel en el incremento de la furosina ya se ha descrito en papillas con cereales y/o soja, aunque sin proteína láctea (Guerra-Hernández et al., 1999; Guerra-Hernández y Corzo, 1996).

Las frutas (manzana, naranja y plátano) presentes en la muestra C (1.1%) contribuyen a aumentar el contenido de monosacáridos, pero en menor proporción que la miel (glucosa 0.02-0.04 g/100g papilla y fructosa 0.03-0.06 g/100g papilla) (cálculo realizado según se ha mencionado para la miel). La menor contribución de las frutas si se compara con la miel podría explicar la ausencia de diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las muestras C y A (sólo a base de cereales y leche).

La comparación de los resultados obtenidos con datos bibliográficos no es fácil, pues la información relativa a contenidos de furosina en papillas infantiles es escasa. Además, la composición de los

productos que se incluyen en esta categoría es muy variada, y pueden contener leche o no. Además, se utilizan distintos procesos de fabricación y los productos finales pueden comercializarse en forma líquida o en polvo.

En papillas de cereales que contienen miel en cantidad desconocida, se mencionan contenidos de furosina mayores a los obtenidos en el presente estudio. Así, en papillas a base de leche, arroz y miel se han señalado contenidos de 4.3 mg/g proteína (Carratù et al., 1993), frente al 3.4 mg/g proteína obtenido en las muestras B recién fabricadas de este estudio. Al desconocer la contribución de los distintos ingredientes de la papilla, así como el proceso de fabricación, resulta difícil explicar las diferencias.

En papillas en polvo de cereales con miel y soja, pero sin leche añadida, se indican contenidos de furosina (en mg/g proteína) de 7.3 (Guerra-Hernández et al., 1999) y de 13.7 (Guerra-Hernández y Corzo, 1996), o de 8.2 en muestras sin soja (Guerra-Hernández y Corzo, 1996). Los mismos autores (Guerra-Hernández y Corzo, 1996; Guerra-Hernández et al., 1999), en papillas a base de cereales con frutas, señalan contenidos de furosina de 3.6-18.6 mg/g proteína. Estos valores son superiores a los obtenidos para las muestras B (0.9% miel) o C (1.1% frutas), pudiendo deberse las diferencias, básicamente, al proceso de fabricación.

En papillas elaboradas sólo con frutas (sin cereales ni leche), los contenidos de furosina (0.4-1.8 mg/g proteína) son menores, lo que es

lógico por su bajo contenido proteico (Rada-Mendoza et al., 2002a y 2004).

#### *Efecto de la temperatura de almacenamiento*

La aplicación de un ANOVA de tres factores (tipo de muestra, temperatura y tiempo) muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los contenidos de furosina para las tres temperaturas de almacenamiento estudiadas. Los valores medios a 25, 30 y 37°C son 3.53, 3.94 y 4.15 mg/ g proteína, respectivamente.

No existe interacción entre la temperatura y el tipo de muestra, es decir, la evolución del contenido de furosina con el aumento de la temperatura muestra un comportamiento similar en los tres tipos de PCL estudiadas.

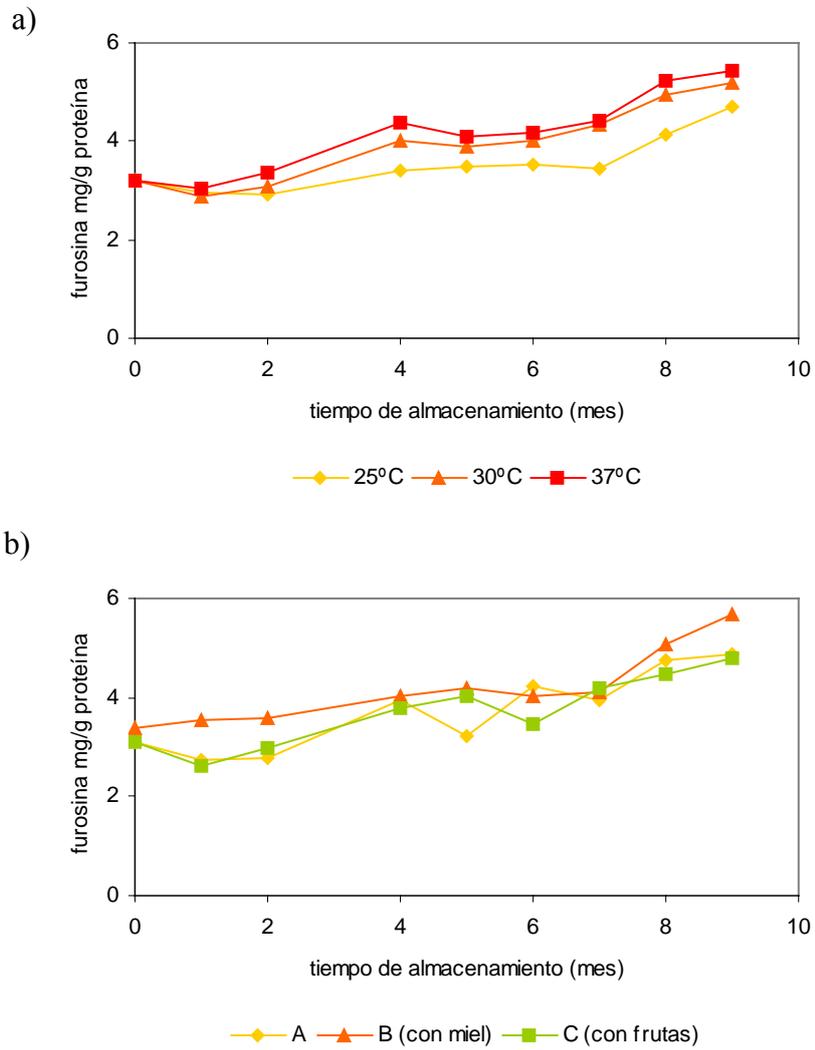
#### *Efecto del tiempo de almacenamiento*

Durante el almacenamiento de las papillas, se observa un incremento gradual de su contenido de furosina. Este incremento depende de la temperatura de almacenamiento y del tipo de muestra, y oscila en un amplio intervalo, desde el 37% en la muestra A (a base sólo de cereales y leche) a 25°C, hasta el 77% en la muestra B (con miel añadida) a 37°C. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los contenidos de furosina obtenidos en los distintos períodos de almacenamiento se muestran en el cuadro 24.

Existen interacciones, estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), entre el tiempo de almacenamiento y la temperatura o el tipo de muestra (figura 21). La formación de furosina durante el almacenamiento es más rápida a 37°C que a 25 y 30°C (figura 21a), especialmente hasta el cuarto mes. Desde este punto y hasta el final del período de almacenamiento, el incremento en la furosina muestra un comportamiento similar a las tres temperaturas (25, 30 y 37°C). El tipo de muestra (A, B y C) también afecta al incremento de furosina (figura 21b), siendo éste más rápido en la muestra B.

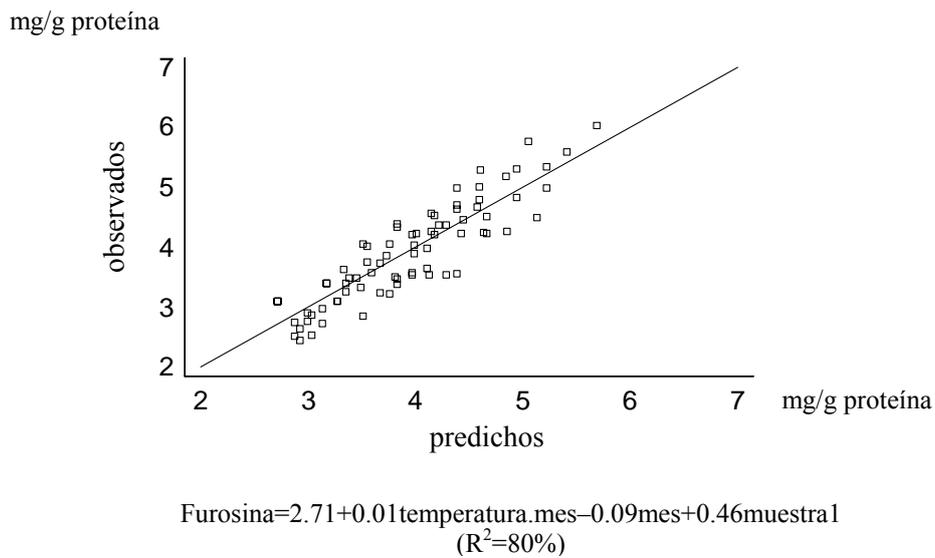
Dado el efecto significativo del tiempo de almacenamiento, la temperatura y el tipo de muestra (ANOVA) en la formación de furosina, se aplica una regresión múltiple para cuantificar el efecto de estos factores. Puesto que el tipo de muestra es una variable cualitativa, en el análisis se utilizan variables *dummy*, es decir, se crean dos variables auxiliares que representen el factor tipo de muestra (*muestra 1* y *muestra 2*) (Jobson, 1991). Los coeficientes de las variables *muestra 1* y *muestra 2* miden, respectivamente, lo que las muestras B (con miel) o C (con frutas) difieren de los valores medios obtenidos para la muestra A (multicereales), tomada como referencia.

Figura 21. Furosina. Interacciones tiempo de almacenamiento-temperatura y tiempo de almacenamiento-tipo de muestra.



La figura 22 muestra los valores observados frente a los predichos para la furosina y la ecuación correspondiente, que explica un porcentaje elevado de la variabilidad encontrada en la formación de furosina ( $R^2 = 80\%$ ). El signo negativo correspondiente al coeficiente de la variable *mes* no significa que el compuesto vaya a disminuir con el tiempo, pues el efecto del tiempo se considera conjuntamente en la variable *temperatura\*mes*, y en todos los casos, para una temperatura dada, la furosina aumenta al incrementar el tiempo. El efecto más importante sobre la formación de furosina es atribuible a la interacción de las variables *temperatura\*mes*.

Figura 22. Valores observados frente a predichos para la furosina y ecuación de regresión múltiple obtenida.



La información bibliográfica disponible sobre el efecto del tiempo de almacenamiento en la formación de furosina en papillas infantiles es escasa. Pueden mencionarse los estudios sobre el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en papillas sólo a base de frutas (Rada-Mendoza et al., 2004) o arroz (Ramírez-Jiménez et al., 2003), en los que se obtiene un aumento del contenido de furosina con la temperatura y el tiempo de almacenamiento.

No se han encontrado trabajos sobre la formación de furosina en los que se estudien las interacciones entre ésta y el tiempo y la temperatura de almacenamiento o se propongan modelos predictivos de su formación durante el almacenamiento.

El incremento del contenido de furosina durante el almacenamiento y con el aumento de la temperatura se ha señalado en productos lácteos, como leche desnatada en polvo (Resmini y Pellegrino, 1994), leche UHT (Corzo et al., 1994), y fórmulas en polvo a base de leche para lactantes (Ferrer et al., 2003b; Calcagno et al., 1996).

El único trabajo comparable al realizado es el estudio de la formación de furosina en papillas a base de cereales con un 40% de leche en polvo, almacenadas en condiciones de laboratorio (25 y 55°C, durante 1, 2, 3 o 4 semanas, en atmósfera de aire y  $A_w=0.65$ , y a 28°C durante 1 o 4 meses) y en condiciones industriales (32 y 55°C durante 1, 3, 6 o 12 meses en atmósfera de aire o nitrogenada) (Ramírez-Jiménez et al., 2004a). Algunas de las papillas contienen distintos cereales con harina de soja, mientras que otras consisten en una mezcla de harina de arroz y maíz. A tiempo cero, los contenidos de furosina de las muestras son

mayores (4.5- 6.12 mg/g proteína) que los encontrados en este trabajo. Se observa un incremento de los contenidos de furosina durante el almacenamiento (excepto a 55°C y  $A_w=0.65$ ), que es mayor en las muestras almacenadas a 25°C en condiciones de laboratorio, considerando el corto periodo de almacenamiento (4 semanas). En condiciones industriales (más similares a las aplicadas en nuestro estudio), se obtienen incrementos de furosina del 61.5% en muestras almacenadas a 32°C durante 12 meses, próximos al 61.3% observado en las muestras almacenadas a 30°C durante 9 meses de este estudio; aunque si se tiene en cuenta que el contenido de leche (88%) de estas últimas es mucho mayor al 40% de las muestras analizadas por Ramírez-Jiménez et al., (2004a), los contenidos de furosina que ellos obtienen son relativamente mayores.

*Porcentaje de lisina bloqueada durante el almacenamiento*

El porcentaje de lisina bloqueada se estima a partir de los contenidos de lisina de las papillas recién fabricadas, determinados por el método AQC (apartado 4.2.1., cuadro 21), y de los valores de furosina obtenidos. Los porcentajes de lisina bloqueada son:

a) en muestras recién fabricadas: 9.5, 10.7 y 10.7% en las papillas A, B y C, respectivamente.

b) tras 9 meses de almacenamiento a 25, 30 y 37°C: 12.8-15.7, 16.0-18.1 y 15.2-16.4% en las papillas A, B y C, respectivamente.

Estos resultados muestran que el bloqueo de lisina no sólo es importante durante la fabricación de las papillas (valor medio del 10.3%), sino también durante el almacenamiento (valor medio del 6.4%).

Los porcentajes de bloqueo de lisina obtenidos en muestras recién fabricadas son similares al 12% obtenido por Pizzoferrato et al. (1998) en papillas a base de arroz y leche, listas para el consumo y no almacenadas.

En papillas de cereales con un 40% de leche, almacenadas 12 meses a 32°C, el porcentaje de bloqueo lisina fue del 8% (Ramírez-Jiménez et al., 2004b). Esta pérdida es comparable a la encontrada en las papillas analizadas, teniendo en cuenta que el almacenamiento fue sólo de 9 meses. El almacenamiento de las mismas papillas a 25°C y  $A_w = 0.65$  durante 1 mes, produjo pérdidas mucho mayores (del 13%), ya que la  $A_w$  está en el intervalo óptimo para el desarrollo de la MR ( $A_w = 0.55-0.75$ ) (Cheftel y Cheftel, 1999); mientras que en las papillas de este estudio la  $A_w = 1.00$  (ver apartado 2 de la parte experimental).

Se han señalado porcentajes de pérdidas de lisina en leche como consecuencia de un tratamiento UHT del 1- 4% (Erbersdobler y Hupe, 1991; Schaafsma, 1989; Morales et al., 1996b). Estos porcentajes son inferiores a los estimados en las papillas analizadas, probablemente debido a que en la fabricación se ha utilizado leche pasteurizada y secada por spray, antes de su incorporación a la papilla como ingrediente, en una etapa previa al tratamiento UHT.

#### 4.3.2. Compuestos fluorescentes (AGEs fluorescentes)

Los valores obtenidos para pentodil-lisina y AGEs, libres y totales, en las papillas analizadas (A, B y C), almacenadas a 25, 30 y 37°C durante 9 meses, se muestran en los cuadros 25, 26, 27 y 28. Los valores se expresan como % IF (intensidad de fluorescencia) y son la media de cuatro determinaciones.

Las  $\lambda$ excitación (347 nm) y  $\lambda$ emisión (415 nm) utilizadas para medir los AGEs se confirman mediante el registro de los espectros y se observa que corresponden a máximos. Estas longitudes de onda se han utilizado para medir los AGEs en sistemas modelo, leche (Morales y van Boekel, 1997; Morales et al., 1996a), y fórmulas para lactantes (Ferrer et al., 2005b). Sin embargo, otros autores usan longitudes de onda distintas en sistemas modelo (Leclère et al., 2002) y leche (Siegl et al., 2000). Por otra parte, para determinar los compuestos fluorescentes de sistemas modelo similares a la leche y de alimentos tratados térmicamente, como leche y cereales de desayuno, se ha propuesto el índice FAST (Birlouez-Aragon et al., 2001; Leclère y Birlouez-Aragon, 2001; Birlouez-Aragon et al., 2002; Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005; Guan et al., 2005).

Cuadro 25. Pentodil-lisina libre en las PCL analizadas, expresada como % IF respecto a un patrón de sulfato de quinina de 7.5 µg/mL.

PCL	Mes	25°C	30°C	37°C
A	0		10.7±0.1 <sup>a</sup>	
	1	11.7±0.4 <sup>b</sup>	11.5±0.7 <sup>b</sup>	12.2±0.3 <sup>b</sup>
	2	11.0±0.3 <sup>b</sup>	11.8±0.1 <sup>b</sup>	12.2±0.1 <sup>b</sup>
	4	10.6±0.3 <sup>c</sup>	13.0±0.5 <sup>c</sup>	13.4±0.3 <sup>c</sup>
	5	12.4±0.5 <sup>d</sup>	14.6±0.4 <sup>d</sup>	16.2±0.3 <sup>d</sup>
	6	13.4±0.8 <sup>e</sup>	16.8±0.5 <sup>e</sup>	19.9±0.9 <sup>e</sup>
	7	11.4±0.6 <sup>d</sup>	14.4±0.1 <sup>d</sup>	17.0±0.5 <sup>d</sup>
	8	10.2±0.2 <sup>f</sup>	13.3±0.2 <sup>f</sup>	16.8±0.2 <sup>f</sup>
	9	11.8±0.6 <sup>e,f</sup>	14.3±0.3 <sup>e,f</sup>	18.5±0.4 <sup>e,f</sup>
	B (con miel)	0		12.3±0.8 <sup>a</sup>
1		13.0±0.1 <sup>b</sup>	13.6±0.2 <sup>b</sup>	14.9±0.8 <sup>b</sup>
2		12.7±0.1 <sup>b</sup>	13.5±0.2 <sup>b</sup>	15.0±0.5 <sup>b</sup>
4		14.0±0.2 <sup>c</sup>	15.5±0.3 <sup>c</sup>	18.5±0.9 <sup>c</sup>
5		13.0±0.2 <sup>d</sup>	15.7±0.2 <sup>d</sup>	18.1±0.4 <sup>d</sup>
6		13.9±0.2 <sup>e</sup>	16.7±0.4 <sup>e</sup>	20.4±0.5 <sup>e</sup>
7		12.4±0.3 <sup>d</sup>	15.1±0.4 <sup>d</sup>	18.7±0.3 <sup>d</sup>
8		14.7±0.3 <sup>f</sup>	18.4±0.6 <sup>f</sup>	22.2±0.5 <sup>f</sup>
9		14.5±0.2 <sup>e,f</sup>	18.5±0.3 <sup>e,f</sup>	23.0±0.3 <sup>e,f</sup>
C (con frutas)		0		11.8±0.2 <sup>a</sup>
	1	13.8±0.3 <sup>b</sup>	14.1±0.6 <sup>b</sup>	15.4±0.4 <sup>b</sup>
	2	13.5±0.6 <sup>b</sup>	14.8±0.4 <sup>b</sup>	15.7±0.1 <sup>b</sup>
	4	13.8±0.3 <sup>c</sup>	16.6±0.8 <sup>c</sup>	17.3±0.3 <sup>c</sup>
	5	14.1±0.8 <sup>d</sup>	16.9±0.7 <sup>d</sup>	18.5±0.7 <sup>d</sup>
	6	15.1±0.6 <sup>e</sup>	18.5±0.3 <sup>e</sup>	21.5±0.5 <sup>e</sup>
	7	12.6±0.2 <sup>d</sup>	16.5±0.2 <sup>d</sup>	19.3±0.3 <sup>d</sup>
	8	14.2±0.6 <sup>f</sup>	17.7±0.2 <sup>f</sup>	21.0±0.4 <sup>f</sup>
	9	14.0±0.6 <sup>e,f</sup>	16.3±0.5 <sup>e,f</sup>	21.0±0.4 <sup>e,f</sup>

Superíndices distintos para los valores de una misma columna dentro de cada tipo de PCL indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

Cuadro 26. Pentodil-lisina total en las PCL analizadas, expresada como % IF respecto a un patrón de sulfato de quinina de 7.5 µg/mL.

PCL	Mes	25°C	30°C	37°C
A	0		106.4±2.8 <sup>g</sup>	
	1	121.1±3.7 <sup>h</sup>	127.0±2.0 <sup>h</sup>	153.8±6.7 <sup>h</sup>
	2	115.6±2.6 <sup>h</sup>	130.5±2.8 <sup>h</sup>	160.7±5.6 <sup>h</sup>
	4	140.6±5.5 <sup>i</sup>	181.6±5.6 <sup>i</sup>	210.9±3.9 <sup>i</sup>
	5	124.4±1.3 <sup>i</sup>	178.9±1.6 <sup>i</sup>	206.6±2.6 <sup>i</sup>
	6	131.9±2.2 <sup>j</sup>	186.9±5.6 <sup>j</sup>	232.6±5.8 <sup>j</sup>
	7	156.7±4.9 <sup>k</sup>	217.2±4.7 <sup>k</sup>	260.0±7.3 <sup>k</sup>
	8	159.6±10.6 <sup>l</sup>	220.0±5.4 <sup>l</sup>	273.0±3.1 <sup>l</sup>
	9	145.1±10.0 <sup>k,l</sup>	206.3±4.6 <sup>k,l</sup>	267.6±8.6 <sup>k,l</sup>
	B (con miel)	0		142.7±5.5 <sup>g</sup>
1		180.6±2.4 <sup>h</sup>	197.1±3.6 <sup>h</sup>	215.5±3.0 <sup>h</sup>
2		167.5±5.3 <sup>h</sup>	183.2±7.1 <sup>h</sup>	207.6±6.1 <sup>h</sup>
4		166.9±4.1 <sup>i</sup>	211.9±5.1 <sup>i</sup>	246.6±3.2 <sup>i</sup>
5		168.0±1.4 <sup>i</sup>	226.5±10.4 <sup>i</sup>	275.1±7.2 <sup>i</sup>
6		190.2±2.8 <sup>j</sup>	257.5±4.4 <sup>j</sup>	308.2±7.8 <sup>j</sup>
7		194.7±3.2 <sup>k</sup>	265.4±5.5 <sup>k</sup>	339.5±13.0 <sup>k</sup>
8		205.3±7.5 <sup>l</sup>	280.2±9.2 <sup>l</sup>	354.7±6.7 <sup>l</sup>
9		210.6±13.2 <sup>k,l</sup>	281.6±12.1 <sup>k,l</sup>	347.7±19.7 <sup>k,l</sup>
C (con frutas)		0		118.4±2.7 <sup>g</sup>
	1	142.7±1.5 <sup>h</sup>	149.1±6.2 <sup>h</sup>	167.9±5.7 <sup>h</sup>
	2	133.5±3.7 <sup>h</sup>	152.6±2.3 <sup>h</sup>	182.6±9.3 <sup>h</sup>
	4	136.8±2.3 <sup>i</sup>	190.1±2.0 <sup>i</sup>	208.1±3.6 <sup>i</sup>
	5	139.5±2.5 <sup>i</sup>	204.4±6.7 <sup>i</sup>	232.0±3.0 <sup>i</sup>
	6	146.6±1.2 <sup>j</sup>	226.3±5.9 <sup>j</sup>	260.7±6.2 <sup>j</sup>
	7	151.0±4.2 <sup>k</sup>	225.1±3.9 <sup>k</sup>	271.6±6.2 <sup>k</sup>
	8	188.2±13.5 <sup>l</sup>	243.0±11.1 <sup>l</sup>	291.2±12.0 <sup>l</sup>
	9	169.6±6.6 <sup>k,l</sup>	231.3±11.0 <sup>k,l</sup>	289.0±11.6 <sup>k,l</sup>

Superíndices distintos para los valores de una misma columna dentro de cada tipo de PCL indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) con respecto al tiempo de almacenamiento.

Cuadro 27. AGEs libres en las PCL analizadas, expresados como % IF respecto a un patrón de sulfato de quinina de 0.5 µg/mL.

PCL	Mes	25°C	30°C	37°C
A	0		8.7±0.1 <sup>a</sup>	
	1	9.9±0.4 <sup>b</sup>	9.4±0.1 <sup>b</sup>	9.9±0.1 <sup>b</sup>
	2	9.1±0.3 <sup>b</sup>	9.5±0.2 <sup>b</sup>	9.8±0.1 <sup>b</sup>
	4	8.9±0.2 <sup>c</sup>	10.7±0.5 <sup>c</sup>	10.9±0.3 <sup>c</sup>
	5	9.7±0.1 <sup>c</sup>	11.1±0.4 <sup>c</sup>	12.4±0.1 <sup>c</sup>
	6	11.0±0.4 <sup>d</sup>	13.5±0.5 <sup>d</sup>	15.8±0.4 <sup>d</sup>
	7	9.4±0.2 <sup>c</sup>	11.8±0.2 <sup>c</sup>	13.9±0.3 <sup>c</sup>
	8	7.4±0.2 <sup>e</sup>	9.9±0.2 <sup>e</sup>	12.7±0.1 <sup>e</sup>
	9	10.1±0.6 <sup>f</sup>	12.3±0.4 <sup>f</sup>	15.8±0.4 <sup>f</sup>
	B (con miel)	0		10.0±0.3 <sup>a</sup>
1		10.0±0.1 <sup>b</sup>	10.6±0.4 <sup>b</sup>	11.1±0.3 <sup>b</sup>
2		10.2±0.3 <sup>b</sup>	10.7±0.1 <sup>b</sup>	11.7±0.4 <sup>b</sup>
4		11.7±0.1 <sup>c</sup>	12.6±0.2 <sup>c</sup>	14.8±0.7 <sup>c</sup>
5		10.7±0.2 <sup>c</sup>	12.9±0.6 <sup>c</sup>	14.1±0.1 <sup>c</sup>
6		11.2±0.7 <sup>d</sup>	12.8±0.3 <sup>d</sup>	15.5±0.4 <sup>d</sup>
7		9.6±0.9 <sup>c</sup>	11.1±0.3 <sup>c</sup>	13.7±0.2 <sup>c</sup>
8		11.5±0.2 <sup>e</sup>	14.4±0.4 <sup>e</sup>	17.8±0.3 <sup>e</sup>
9		11.4±0.2 <sup>f</sup>	14.5±0.2 <sup>f</sup>	17.9±0.2 <sup>f</sup>
C (con frutas)		0		9.7±0.2 <sup>a</sup>
	1	10.2±0.4 <sup>b</sup>	10.3±0.2 <sup>b</sup>	10.8±0.3 <sup>b</sup>
	2	10.5±0.5 <sup>b</sup>	11.4±0.3 <sup>b</sup>	12.0±0.4 <sup>b</sup>
	4	11.0±0.2 <sup>c</sup>	12.8±0.5 <sup>c</sup>	13.7±0.3 <sup>c</sup>
	5	11.0±0.7 <sup>c</sup>	12.8±0.3 <sup>c</sup>	14.1±0.5 <sup>c</sup>
	6	12.0±0.2 <sup>d</sup>	14.4±0.2 <sup>d</sup>	16.9±0.3 <sup>d</sup>
	7	9.1±0.2 <sup>c</sup>	12.1±0.1 <sup>c</sup>	14.2±0.2 <sup>c</sup>
	8	11.6±0.1 <sup>e</sup>	14.6±0.2 <sup>e</sup>	17.3±0.3 <sup>e</sup>
	9	12.9±0.8 <sup>f</sup>	15.1±0.2 <sup>f</sup>	19.4±0.3 <sup>f</sup>

Superíndices distintos para los valores de una misma columna dentro de cada tipo de PCL indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

Cuadro 28. AGEs totales en las PCL analizadas, expresados como % IF respecto a un patrón de sulfato de quinina de 0.5 µg/mL.

PCL	Mes	25°C	30°C	37°C
A	0		64.7±0.8 <sup>g</sup>	
	1	72.2±2.5 <sup>h</sup>	74.9±1.5 <sup>h</sup>	87.3±5.8 <sup>h</sup>
	2	65.7±1.7 <sup>h</sup>	72.5±2.2 <sup>h</sup>	89.0±6.2 <sup>h</sup>
	4	69.7±4.1 <sup>i</sup>	87.8±2.8 <sup>i</sup>	101.6±2.0 <sup>i</sup>
	5	73.2±0.7 <sup>j</sup>	100.2±1.5 <sup>j</sup>	116.0±2.0 <sup>j</sup>
	6	77.9±3.0 <sup>k</sup>	103.9±3.0 <sup>k</sup>	126.5±3.0 <sup>k</sup>
	7	82.6±2.8 <sup>l</sup>	107.7±4.3 <sup>l</sup>	133.7±6.2 <sup>l</sup>
	8	96.1±6.1 <sup>m</sup>	128.6±4.1 <sup>m</sup>	156.7±1.8 <sup>m</sup>
	9	94.1±7.1 <sup>m</sup>	130.0±4.2 <sup>m</sup>	171.1±7.3 <sup>m</sup>
	B (con miel)	0		82.7±4.5 <sup>g</sup>
1		93.3±2.2 <sup>h</sup>	100.3±1.7 <sup>h</sup>	114.5±4.7 <sup>h</sup>
2		88.6±3.8 <sup>h</sup>	95.0±3.4 <sup>h</sup>	107.7±2.8 <sup>h</sup>
4		99.1±1.6 <sup>i</sup>	125.7±4.1 <sup>i</sup>	148.0±2.4 <sup>i</sup>
5		101.8±1.1 <sup>j</sup>	133.6±6.7 <sup>j</sup>	162.0±4.3 <sup>j</sup>
6		102.8±0.9 <sup>k</sup>	133.6±5.9 <sup>k</sup>	160.1±5.4 <sup>k</sup>
7		110.2±5.1 <sup>l</sup>	145.6±4.0 <sup>l</sup>	185.8±7.3 <sup>l</sup>
8		115.6±5.6 <sup>m</sup>	153.8±6.2 <sup>m</sup>	192.9±7.4 <sup>m</sup>
9		129.8±8.5 <sup>m</sup>	167.5±6.4 <sup>m</sup>	211.1±14.3 <sup>m</sup>
C (con frutas)		0		72.8±1.7 <sup>g</sup>
	1	82.3±1.6 <sup>h</sup>	85.3±3.2 <sup>h</sup>	94.0±1.4 <sup>h</sup>
	2	75.8±2.9 <sup>h</sup>	86.3±1.4 <sup>h</sup>	98.9±5.5 <sup>h</sup>
	4	81.8±2.3 <sup>i</sup>	110.0±2.1 <sup>i</sup>	117.4±2.5 <sup>i</sup>
	5	85.5±1.9 <sup>j</sup>	121.8±7.1 <sup>j</sup>	135.2±3.2 <sup>j</sup>
	6	91.1±1.4 <sup>k</sup>	132.1±3.9 <sup>k</sup>	152.9±4.2 <sup>k</sup>
	7	89.7±3.6 <sup>l</sup>	127.7±4.1 <sup>l</sup>	156.4±4.1 <sup>l</sup>
	8	114.1±11.7 <sup>m</sup>	145.4±8.9 <sup>m</sup>	174.8±7.9 <sup>m</sup>
	9	101.3±4.8 <sup>m</sup>	134.3±7.0 <sup>m</sup>	166.5±8.1 <sup>m</sup>

Superíndices distintos para los valores de una misma columna dentro de cada tipo de PCL indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) con respecto al tiempo de almacenamiento.

La mayoría de compuestos fluorescentes están unidos de forma covalente a proteínas, mientras que sólo una pequeña parte se encuentran en forma libre, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Morales y van Boekel (1997) en sistemas modelo de glucosa o lactosa/caseína tratados térmicamente y por Ferrer et al. (2005b) en fórmulas para lactantes.

Se encuentran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tres tipos de muestras (A, B y C), en los AGEs y la pentodil-lisina libres y totales, excepto entre las muestras B y C para los valores de pentodil-lisina libre. En todos los casos, los menores valores de intensidad de fluorescencia corresponden a la muestra A (PCL sin miel ni frutas). Si se tiene en cuenta que los tres tipos de muestras se han sometido al mismo tratamiento térmico y que contienen leche de la misma calidad y en la misma proporción, las diferencias pueden atribuirse al menor contenido de monosacáridos de la muestra A.

La pentodil-lisina puede formarse por la reacción entre los residuos de lisina de la caseína y el ácido ascórbico (9.7 mg/100 g), presentes en los tres tipos de muestras. Éstas también contienen hierro (1.1 mg/100 g) añadido, que puede catalizar o favorecer la oxidación del ácido ascórbico a dehidroascorbico y productos de degradación (treosa), con elevado poder glicante (Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005; Birlouez-Aragon et al., 1999; Leclère et al., 2002). En las muestras con miel (B) o frutas (C), la pentodil-lisina puede también proceder de las pentosas (arabinosa y xilosa) presentes.

No se han encontrado trabajos sobre compuestos fluorescentes en papillas infantiles con una composición similar a las de este estudio, lo que no permite comparar los resultados obtenidos con datos bibliográficos. La formación de compuestos fluorescentes se ha monitorizado en el procesado de la leche y la fabricación de fórmulas para lactantes (Morales et al., 1996a; Birlouez-Aragon et al., 1998; Birlouez-Aragon et al., 1999; Siegl et al., 2000; Birlouez-Aragon et al., 2001; Leclère y Birlouez-Aragon, 2001; Leclère et al., 2002; Kulmyrzaev y Dufour, 2002; Birlouez-Aragon et al., 2002; Birlouez-Aragon et al., 2004; Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005; Guan et al., 2005; Birlouez-Aragon et al., 2005; Ferrer et al., 2005b), pero no es posible comparar los resultados obtenidos en este estudio porque las temperaturas de procesado son habitualmente más elevadas que las de almacenamiento, se utilizan longitudes de onda diferentes en la medición y/o los resultados se expresan en %IF respecto a patrones de distinta concentración.

#### *Efecto de la temperatura de almacenamiento*

El ANOVA aplicado para evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los contenidos de AGEs y pentodil-lisina libres y totales muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tres temperaturas estudiadas, correspondiendo los %IF más altos a la temperatura más elevada (37°C). Sin embargo, la temperatura no influye en la formación de AGEs libres y totales en fórmulas para lactantes almacenadas durante 9-24 meses a 20 y 37°C Ferrer et al. (2005b).

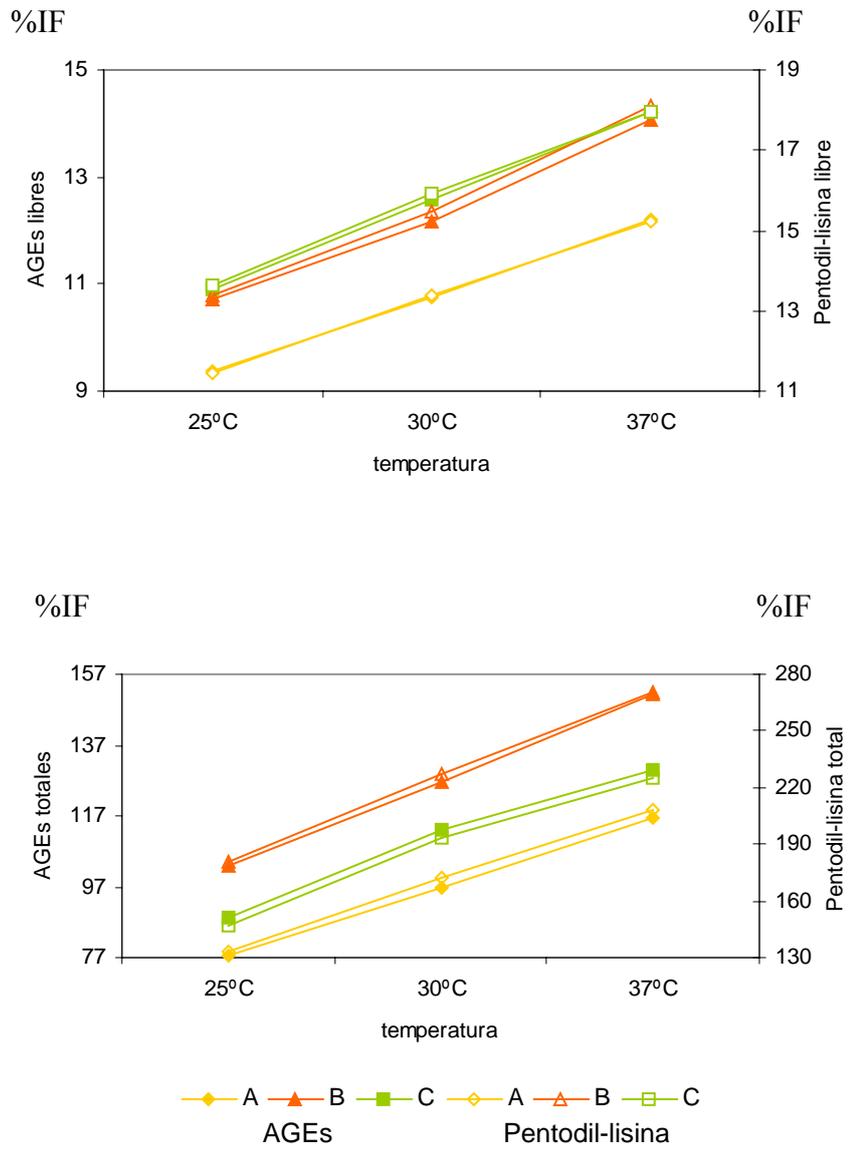
En los AGEs y la pentodil-lisina, libres y totales, se observa una interacción entre la temperatura de almacenamiento y el tipo de muestra, es decir, el efecto de la temperatura sobre los compuestos fluorescentes depende del tipo de papilla (figura 23). El mayor incremento de fluorescencia corresponde a la muestra B para un aumento de temperatura de 30 a 37°C, y sólo puede justificarse por los monosacáridos que aporta la miel a esta papilla. En las tres muestras se observa que los AGEs y la pentodil-lisina evolucionan de forma similar con la temperatura (paralela, pero a distinto % de IF).

#### *Efecto del tiempo de almacenamiento*

Durante el almacenamiento aumentan de forma gradual los AGEs y la pentodil-lisina libres y totales (cuadros 25, 26, 27 y 28). Los de % IF más altos corresponden a la temperatura de 37°C, lo que concuerda con la interacción observada entre tiempo de almacenamiento y temperatura. AGEs y pentodil-lisina evolucionan de forma similar a lo largo del almacenamiento a 25, 30 y 37°C.

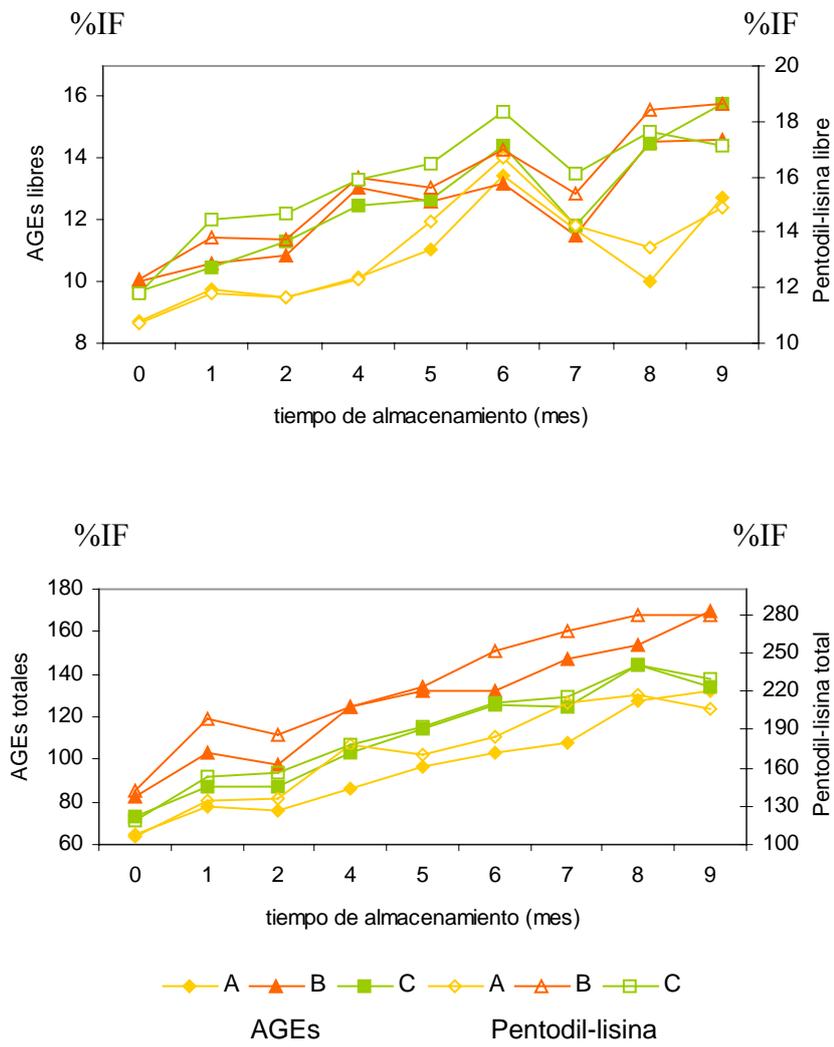
En los AGEs y pentodil-lisina libres y totales se encuentra interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tipo de muestra (figura 24): la formación de los compuestos fluorescentes durante el almacenamiento depende del tipo de PCL; pero no es posible atribuir a una muestra concreta los mayores o menores valores.

Figura 23. Compuestos fluorescentes. Interacciones temperatura de almacenamiento - tipo de muestra.



A: PCL  
 B: PCL con miel  
 C: PCL con frutas

Figura 24. Compuestos fluorescentes. Interacciones tiempo de almacenamiento - tipo de muestra.



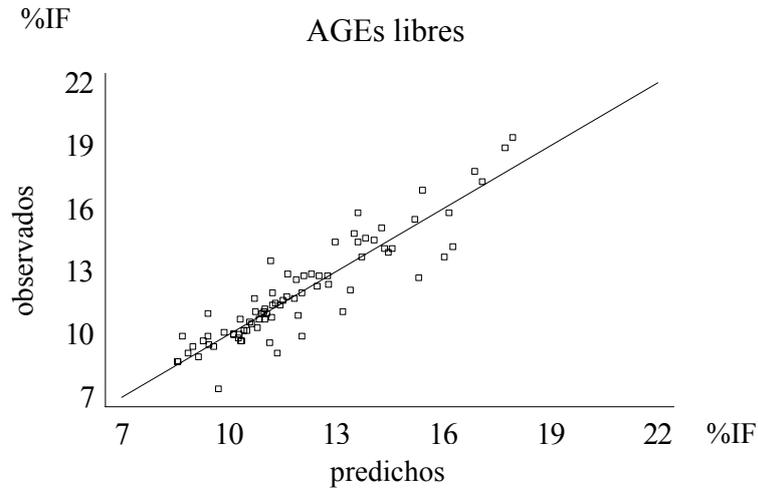
A: PCL  
 B: PCL con miel  
 C: PCL con frutas

El tiempo de almacenamiento aumenta de forma estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) los valores de fluorescencia, al igual que ocurre en fórmulas para lactantes almacenadas a 20 y 37°C durante 9 y 24 meses (Ferrer et al. 2005b). Sin embargo, en leche de vaca y leche enriquecida almacenadas a temperatura ambiente durante 4 meses, no se observa prácticamente desarrollo de los productos avanzados de la RM (Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005). Este resultado contrasta con los obtenidos en este estudio, pues a 25°C a partir del primer mes ya se observa un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de los compuestos fluorescentes determinados; si bien, el aumento empieza a ser más pronunciado a partir del cuarto mes, corroborando el período de inducción en el desarrollo de los compuestos fluorescentes descrito previamente (Morales y van Boekel, 1997; Matiacevich y Buera, 2006).

Las correlaciones parciales entre AGEs libres y unidos a proteínas, y entre pentodil-lisina libre y unida a proteínas, no son significativas, lo que sugiere diferentes vías de formación. Así, los compuestos unidos a proteínas no procederían de la polimerización de los compuestos libres, ni éstos de la liberación de los unidos a proteínas. En cambio, las correlaciones totales entre AGEs libres y unidos a proteínas ( $r = 0.850$ ), y entre pentodil-lisina libre y unida a proteínas ( $r = 0.873$ ) son importantes. Estos resultados son razonables si se considera que las variables aumentan con el incremento del tiempo de almacenamiento.

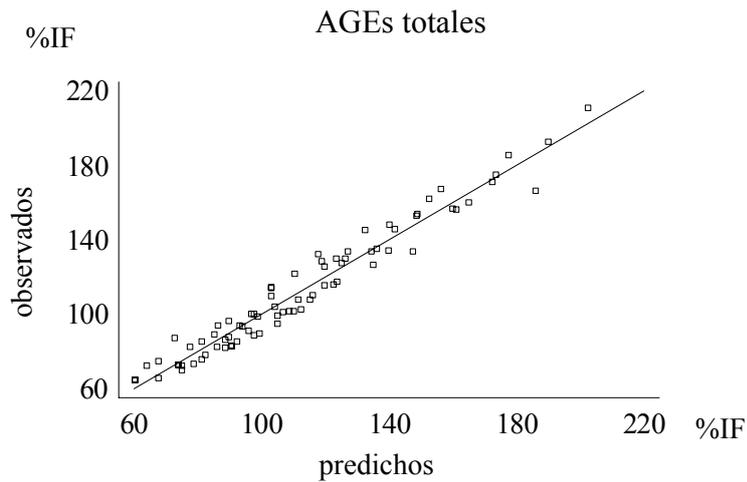
Dado el efecto significativo del tiempo de almacenamiento, la temperatura y el tipo de muestra (ANOVA) en la formación de compuestos fluorescentes, se aplica una regresión múltiple para cuantificar el efecto de estos factores sobre la formación de compuestos fluorescentes. Las figuras 25 y 26 muestran los valores observados frente a los predichos para AGEs y pentodil-lisina, libres y totales, y las ecuaciones correspondientes. En todos los casos, la ecuación explica un porcentaje elevado de la variabilidad encontrada en la formación de los compuestos fluorescentes ( $R^2 = 85$  y  $96\%$ , para AGEs libres y totales, respectivamente;  $R^2 = 88$  y  $95\%$ , para pentodil-lisina libre y total, respectivamente). El efecto más importante sobre la formación de los compuestos fluorescentes es la interacción de las variables *temperatura\*mes*.

Figura 25. Valores observados frente a predichos para AGEs libres y totales y ecuaciones de regresión múltiple obtenidas.



$$\text{AGEs libres} = 8.57 + 0.06 \text{temperatura.mes} - 1.31 \text{mes} + 1.57 \text{muestra1} + 1.79 \text{muestra2}$$

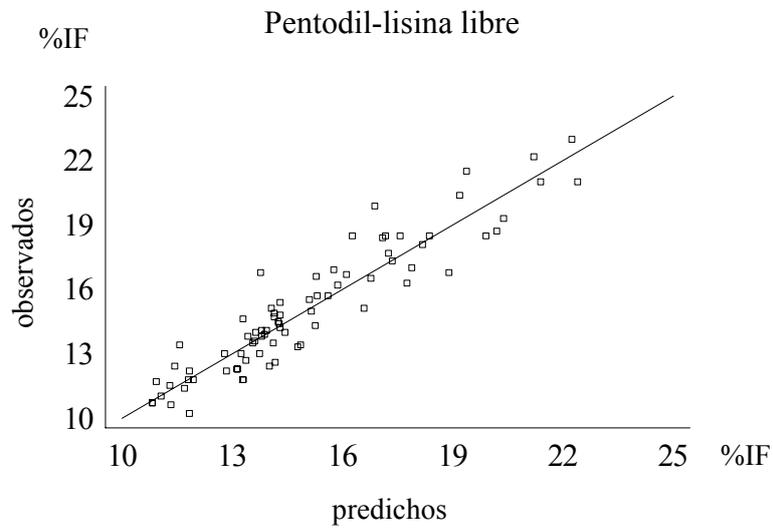
( $R^2 = 85\%$ )



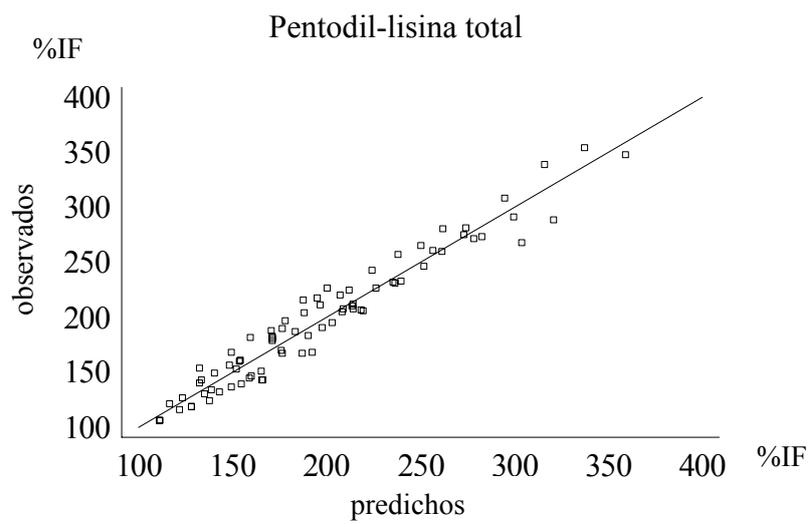
$$\text{AGEs totales} = 60.33 + 0.73 \text{temperatura.mes} - 14.66 \text{mes} + 30.13 \text{muestra1} + 13.55 \text{muestra2}$$

( $R^2 = 96\%$ )

Figura 26. Valores observados frente a predichos para pentodil-lisina libre y total y ecuaciones de regresión múltiple obtenidas.



$$\text{Pentodil-lisina libre} = 10.81 + 0.07\text{temperatura.mes} - 1.72\text{mes} + 2.31\text{muestra1} + 2.49\text{muestra2} \quad (R^2=88\%)$$



$$\text{Pentodil-lisina total} = 111.17 + 1.35\text{temperatura.mes} - 28.35\text{mes} + 54.90\text{muestra1} + 17.05\text{muestra2} \quad (R^2=95\%)$$

### 4.3.3. Color

Los valores medios de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  y el incremento del color ( $\Delta E^*$ ) de las tres muestras (A, B, C) almacenadas a 25, 30 y 37°C durante 9 meses se muestran en el cuadro 29 y la figura 27, respectivamente.

La luminosidad ( $L^*$ ) disminuye al aumentar la temperatura y el tiempo de almacenamiento, debido a la formación de pigmentos pardos. Por el contrario, los valores de  $a^*$  y  $b^*$  aumentan, lo que indica un incremento en las características rojas y amarillas del sistema (Calvo, 2004). La disminución de  $L^*$  y el aumento de  $a^*$  y  $b^*$  con el incremento de la temperatura y tiempo de almacenamiento ya se han descrito (Rampilli y Andreini, 1992; Rossi y Pompei, 1991).

Cuadro 29. Valores medios (n=4) de los parámetros de la medida del color L\*, a\* y b\* para las tres PCL analizadas.

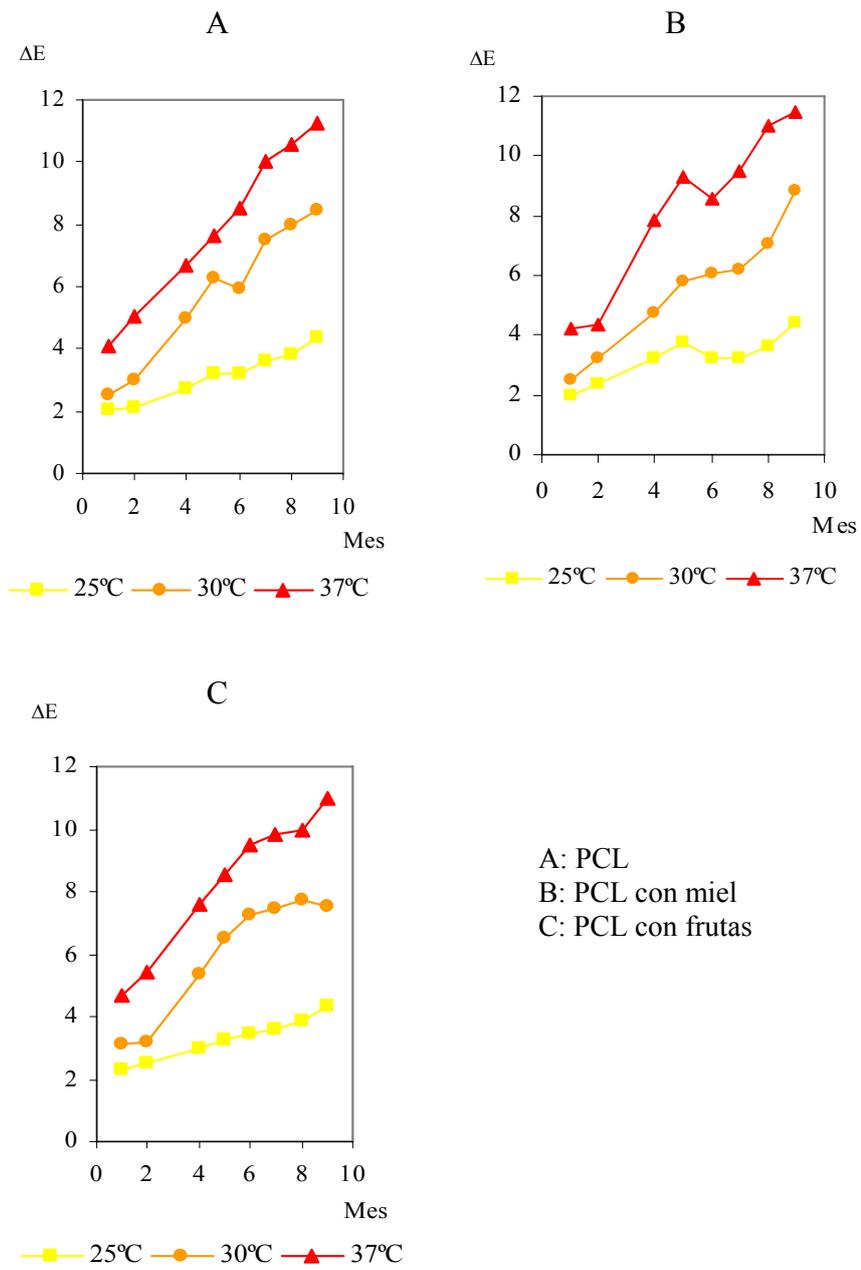
		A			B			C		
Mes		25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C
L*	0	80.67			77.63			77.25		
	1	80.57	80.29	79.83	77.43	76.82	76.31	77.61	77.57	76.81
	2	80.36	79.77	79.10	77.22	76.80	76.01	77.66	77.27	76.66
	4	79.95	79.02	78.32	76.66	75.98	74.39	77.23	76.56	75.78
	5	79.87	78.50	77.79	76.50	74.92	73.70	76.93	76.08	75.10
	6	79.54	78.12	76.97	76.16	74.66	73.20	76.76	75.69	74.71
	7	78.38	76.64	75.34	75.57	74.11	72.11	75.78	74.66	73.43
	8	78.13	75.89	74.68	75.30	73.04	70.90	75.68	74.26	73.02
	9	78.63	76.57	75.08	75.20	72.89	71.71	76.22	75.17	73.42
	a*	0	1.75			3.37			1.44	
1		2.75	2.96	3.37	4.25	4.67	5.19	2.54	2.73	3.33
2		2.86	3.39	4.09	4.44	4.86	5.33	2.51	2.83	3.64
4		2.76	3.58	4.19	4.33	5.02	6.11	2.42	3.26	4.04
5		2.70	3.70	4.28	4.15	5.72	6.13	2.43	3.62	4.19
6		2.89	3.92	4.84	4.83	5.91	6.93	2.50	3.71	4.49
7		2.88	4.06	5.05	4.15	5.24	6.51	2.49	3.74	4.57
8		3.11	4.65	5.62	4.62	6.00	7.32	2.78	4.24	5.23
9		3.21	4.67	5.45	5.19	6.06	7.08	3.00	3.89	5.19
b*		0	18.90			21.59			16.44	
	1	20.68	21.11	22.55	23.34	23.56	25.18	18.45	19.25	20.67
	2	20.68	21.28	23.08	23.70	24.34	25.10	18.64	19.35	21.39
	4	21.33	23.21	24.65	24.50	25.71	28.17	19.25	21.44	23.40
	5	21.88	23.96	25.53	25.10	26.56	29.55	19.54	22.48	24.23
	6	21.68	23.80	25.93	24.06	26.23	28.00	19.70	23.13	25.07
	7	21.42	24.76	26.70	23.92	26.33	28.64	19.52	23.07	24.96
	8	21.44	24.56	26.75	24.06	26.25	29.38	19.72	23.02	24.67
	9	22.48	25.72	27.96	24.85	28.54	30.71	20.32	23.24	26.03

A: PCL

B: PCL con miel

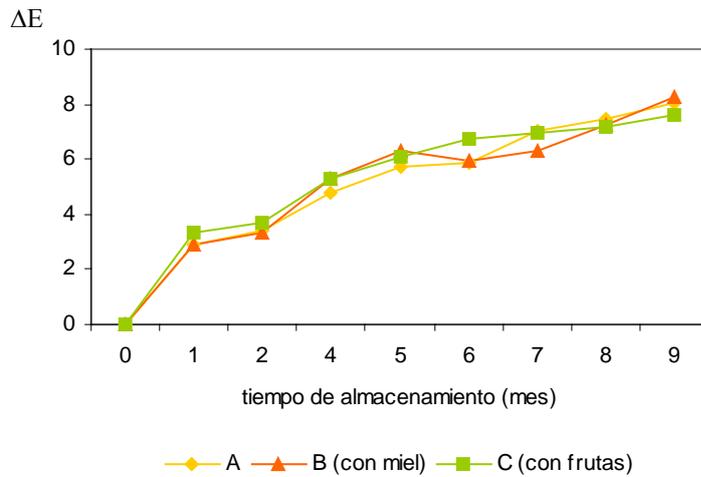
C: PCL con frutas

Figura 27.  $\Delta E$  en las tres PCL analizadas.



Se aplica a los valores de  $\Delta E$  un ANOVA de tres factores y no se encuentran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre las muestras A, B y C. En cambio, existen diferencias entre las tres temperaturas (25, 30 y 37°C): el incremento de color es mayor cuanto mayor es la temperatura (valores medios de 2.86, 5.16 y 7.28, a 25, 30 y 37°C, respectivamente). La evolución de  $\Delta E$  con el aumento de la temperatura es similar en los tres tipos de muestra, y no se encuentra interacción entre temperatura y tipo de muestra. Durante el almacenamiento, se observa un incremento gradual de  $\Delta E$ , que depende de la temperatura y del tipo de muestra (interacciones estadísticamente significativas  $p < 0.05$  entre tiempo y temperatura y entre tiempo y tipo de muestra), como puede verse en la figura 27 y 28, respectivamente.

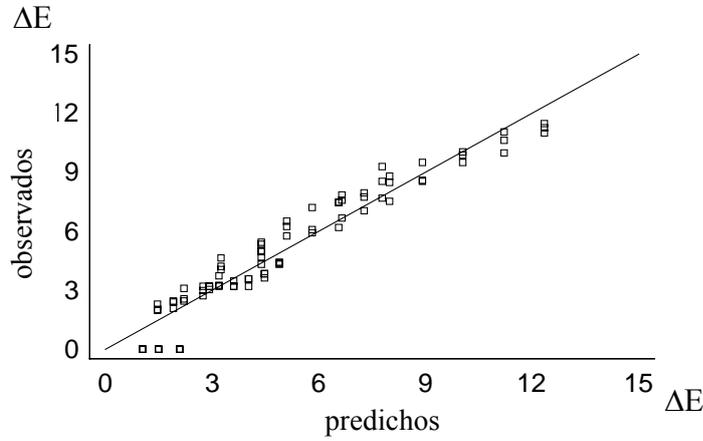
Figura 28. Color  $\Delta E$ . Interacción tiempo de almacenamiento-tipo de muestra.



Se han descrito previamente aumentos de  $\Delta E$  con la temperatura y el tiempo de almacenamiento en leche semidesnatada sometida a un tratamiento UHT indirecto, almacenada a 20°C y 32°C durante 90 días (Rampilli y Andreini, 1992); en papillas infantiles a base de arroz almacenadas a 32°C y 55°C durante 12 meses (Ramírez-Jiménez et al., 2003); y en fórmulas para lactantes almacenadas a 20°C y 37°C durante 24 meses (Ferrer et al., 2005b) y a 4, 20 y 38°C durante 18 meses (Rossi y Pompei, 1991). Por el contrario, no se observa incremento a lo largo del almacenamiento en una papilla infantil a base de arroz, maíz, soja y leche en polvo (40%) almacenada a 32°C durante 12 meses (Ramírez-Jiménez et al., 2004a).

Teniendo en cuenta el efecto significativo del tiempo de almacenamiento y la temperatura (ANOVA), se aplica una regresión múltiple para cuantificar el efecto de estos factores (*tiempo*, *temperatura* e interacción *tiempo\*temperatura*, 3 variables independientes) sobre  $\Delta E$  (variable dependiente). Se obtiene una regresión múltiple para describir la relación que explica el 93% de la variabilidad. La figura 29 muestra los valores observados frente a los predichos para el  $\Delta E$ , y la ecuación a la que se ajusta el modelo.

Figura 29. Valores observados frente a predichos para el  $\Delta E$  y ecuación de regresión múltiple obtenida.



$$\Delta E = -1.169 + 0.088\text{temperatura} - 1.052\text{mes} + 0.059\text{temperatura.mes}$$

( $R^2=93\%$ )

#### 4.3.4. Relación entre los indicadores de las distintas etapas de la RM

El análisis de regresión entre los contenidos de furosina (variable independiente) y los AGEs fluorescentes o color (variables dependientes) muestra que existe una relación significativa ( $p < 0.01$ ) entre los indicadores, ajustándose a modelos lineales capaces de explicar un 72% y un 57% de la variabilidad de AGEs fluorescentes y color, respectivamente (cuadro 30).

En leche tratada térmicamente, se señala una relación menos satisfactoria entre furosina y compuestos fluorescentes de las etapas

avanzadas de la RM (medidos a longitud de onda de excitación y emisión de 350 y 440 nm, respectivamente) ( $r^2=0.69$ ) (Birlouez-Aragon et al., 1998), aunque se trata de un producto no almacenado.

Las correlaciones parciales entre furosina, AGEs fluorescentes y color (cuadro 30) no son significativas; por tanto, no existe relación causa-efecto entre las variables, lo que sugeriría diferentes vías de formación de estos compuestos. En cambio, si se realizan correlaciones totales, se encuentra una correlación importante ( $r>0.755$ ); lo que es lógico si se considera que las tres variables aumentan con el tiempo de almacenamiento.

Cuadro 30. Regresión simple y correlaciones parciales entre los indicadores de la reacción de Maillard.

	Regresión simple	Correlaciones parciales	
	Furosina	Furosina	AGEs fluorescentes
AGEs fluorescentes	$y = -23.85 + 10.06x$ ( $r=0.8510$ )	0.6124	
Color $\Delta E$	$y = -6.04 + 0.83x$ ( $r=0.7547$ )	-0.2925	0.5688

El desarrollo de la fluorescencia con el tiempo puede mostrar un máximo, un aumento continuado o alcanzar un valor constante, según las condiciones (temperatura, pH y Aw) y los compuestos reaccionantes (Matiacevich et al., 2005; Morales y van Boekel, 1997). En este trabajo, se observa un aumento continuo de los compuestos fluorescentes con el tiempo, lo que es de esperar en sistemas donde el desarrollo de la RM está favorecido, como las papillas analizadas.

Para explicar la formación de compuestos fluorescentes y coloreados se han propuesto diferentes esquemas de reacción. Los fluoróforos podrían ser precursores de los pigmentos pardos o la formación de ambos podría ser paralela, dependiendo de las condiciones de reacción. En el caso de que las reacciones fueran consecutivas y la formación de los compuestos fluorescentes fuera limitante, éstos se transformarían en pigmentos y no se acumularían, observándose una disminución de su contenido tras su formación. Sin embargo, si las reacciones fuesen consecutivas y la reacción limitante fuese la formación de pigmentos a partir de compuestos fluorescentes, se acumularían los compuestos fluorescentes. Esto también sería posible en el caso de reacciones paralelas (Matiacevich et al., 2005; Matiacevich y Buera, 2006). Esta última opción parecer ser la que mejor se ajusta a los resultados obtenidos, puesto que no se ha establecido una relación causa-efecto entre los compuestos fluorescentes y coloreados, sugiriendo diferentes vías de formación.

#### 4.4. CML

##### 4.4.1. Optimización del proceso de preparación de sistemas modelo

En el protocolo descrito por Berg et al. (1998), se propone purificar el compuesto formado mediante una diálisis de la mezcla de reacción después de incubar la proteína (BSA) con el ácido glioxílico y el cianoborohidruro sódico. Se dializa durante 24 horas a 5°C empleando tampón fosfato salino (para mantener el pH) y azida sódica (para evitar el desarrollo de microorganismos).

En este trabajo, la diálisis se sustituye por un proceso de ultrafiltración a una velocidad de 5000 g y 25°C con filtros para centrífuga (Centricon) con membrana de tamaño de poro de 10000 Daltons. Se filtra 1 mL de muestra durante 1 hora y 30 minutos; a continuación, se lava la muestra, 1-4 veces, con agua Milli-Q (1 mL), y tras cada lavado se centrifuga (30 minutos). El contenido de CML se determina en las mezclas de reacción, antes y después del proceso de ultrafiltración (con y sin lavados posteriores) y se observa que la presencia de reactivos en exceso no interfiere en la determinación de la CML, por lo que el proceso de ultrafiltración resulta innecesario, lo que reduce los costes de la determinación analítica.

##### 4.4.2. CML en sistemas modelo

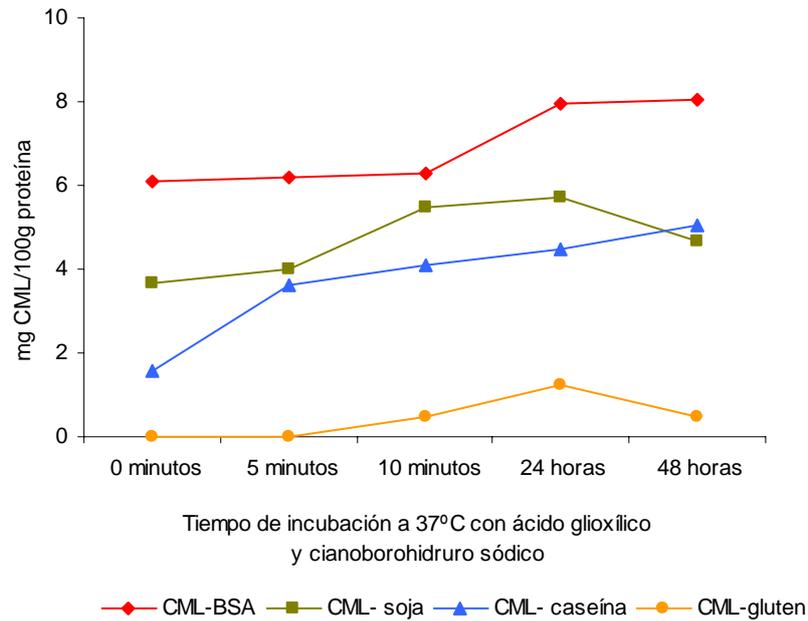
Para conocer la influencia de la fuente proteica en el desarrollo de la RM, se estudia la formación de CML en sistemas modelo preparados con distintas proteínas alimentarias (BSA, soja, caseína y gluten), ácido

glioxílico y cianoborohidruro sódico incubando a 37°C durante distintos tiempos (0, 5 y 10 minutos, 24 y 48 horas). Como puede observarse en la figura 30, la formación de CML depende en gran medida de la naturaleza de la proteína implicada en la reacción. La proteína que proporciona mayor cantidad de CML es la BSA, seguida de la soja, la caseína y el gluten. Por tanto, en las proteínas con mayor número de residuos de lisina, se forma más CML. Además, de las proteínas estudiadas, el gluten es la que presenta mayor número de puentes disulfuro en su estructura, por lo que la accesibilidad a los restos de lisina será menor (Cheftel et al., 1989).

El tiempo de incubación a 37°C con ácido glioxílico y cianoborohidruro sódico necesario para la máxima formación de CML en los sistemas estudiados es de 24 horas en la BSA y en el gluten, y de 10 minutos en la soja. En la caseína, la cantidad de CML formada tras 48 horas de incubación es mayor a la obtenida con tiempos más cortos. En el caso de la soja y el gluten, se observa una disminución de la CML después de incubar a 37°C durante 48 horas, lo que podría deberse a una degradación de este compuesto para dar lugar a compuestos de las etapas finales de la RM.

El porcentaje de lisina modificada (68.7%) obtenido en el sistema CML-caseína para un tiempo de incubación con ácido glioxílico y cianoborohidruro sódico de 24 horas es del orden del mencionado por Faist et al. (2001) empleando similares condiciones de carboximetilación.

Figura 30. Formación de CML en sistemas modelo.



La preparación de CML-BSA muestra un porcentaje de residuos de lisina modificados por formación de CML (31%) similar a la obtenida por Berg et al. (1998), para el mismo tiempo de incubación (10 minutos). El menor tiempo necesario para conseguir el mayor porcentaje de lisina modificada por formación de CML (44%) es de 24 horas. Este porcentaje es inferior al 52% obtenido por Reddy et al. (1995) incubando 24 horas.

No se dispone de información bibliográfica relativa a proteína de soja o gluten carboximetiladas, por lo que no es posible comparar los resultados obtenidos.

#### 4.4.3. Formación de CML a partir de compuestos de Amadori

Algunos autores indican que la fructosil-lisina formada en las etapas iniciales de la RM (compuesto de Amadori) y presente en las muestras podría originar CML durante la hidrólisis ácida, lo que provocaría una sobreestimación. Para evitar este error, se sugiere realizar una reducción con borohidruro sódico 1M, previa a la hidrólisis para transformar la fructosil-lisina en hexitol-lisina, evitando la nueva formación de CML (Hartkopf et al., 1994; Hewedy et al., 1994; Drusch et al., 1999; Faist et al., 2001).

Para comprobar si la hidrólisis de la fructosil-lisina origina CML, se hidrolizan 2 mg de fructosil-lisina (obtenida según el protocolo de Finot y Mauron, 1969) con HCl 6N. Para ello se mezcla 1 mL de patrón de fructosil-lisina de concentración 2 mg/mL con 1 mL de DAP (patrón interno) y 2 mL de HCl 12 N, siendo la concentración final de fructosil-lisina en el hidrolizado de 0.5 mg/mL. Se desgasifica 2 minutos con helio y se calienta a 110°C durante 24 horas. A partir de la fructosil-lisina hidrolizada no se detecta CML.

Se hidrolizan cantidades superiores de fructosil-lisina (1.6, 2.0 y 2.4 mg/mL), y se detecta un 0.5% de CML formada. Otros autores han indicado que alrededor de un 3-5.5% de la fructosil-lisina origina CML, pero realizan la hidrólisis con HCl 7.8N (Dunn et al., 1991; Hartkopf et al., 1994).

Teniendo en cuenta la cantidad de muestra que se hidroliza en el análisis de CML (22 mg de proteína /4 mL HCl 6N) (ver apartado 3.4.1.

de la parte experimental) y las concentraciones de fructosil-lisina hidrolizadas con HCl 6N para detectar CML, en muestras hidrolizadas con concentraciones inferiores a 90.9 mg de fructosil-lisina/g proteína no se detectaría la CML formada a partir de ésta. Las PCL almacenadas 9 meses a 37°C contienen 10.8-13.1 mg fructosil-lisina/g proteína (cálculo realizado considerando la cantidad de furosina obtenida en las muestras y sabiendo que un 46% de fructosil-lisina origina furosina tras la hidrólisis con HCl 8N), por lo que no se detectaría la CML formada a partir de la fructosil-lisina.

A raíz de estas comprobaciones, en las muestras analizadas, no se ha realizado reducción previa con borohidruro, lo que simplifica bastante el proceso.

#### 4.4.4. CML en muestras de alimentos

En el cuadro 31, se indican los contenidos, expresados en mg/100 g de proteína de lisina, CML y LAL de los alimentos, analizados al menos por duplicado.

Las PCL recién fabricadas no contienen ni CML ni LAL, pero en muestras almacenadas a 37°C durante 9 meses se encuentran contenidos de CML comprendidos entre 69.08-118.17 mg/100 g proteína (cuadro 31). Por tanto, la formación de CML requiere un tiempo de almacenamiento prolongado y/o una temperatura de almacenamiento relativamente alta. Hartkopf et al. (1994) detectan CML en una papilla infantil de cereales no almacenada, aunque se trata de contenidos muy bajos (cuadro 32).

Birlouez-Aragon et al. (2004), Fenaille et al. (2006) y Charissou et al. (2007) determinan CML en fórmulas para lactantes (cuadro 32). Las enriquecidas con miel tienen mayores contenidos de productos de glicación (Birlouez-Aragon et al., 2004), al igual que sucede en este trabajo, donde se encuentra mayor contenido en la PCL B (con miel) que en las PCL A y C.

No se encuentra CML ni LAL en leche desnatada esterilizada, leche evaporada, leche condensada, leche en polvo, batido de leche con cacao UHT y pan.

Drusch et al. (1999) tampoco detectan CML en productos lácteos pasteurizados o UHT (tratamiento 140°C, 6-8 segundos), y sugieren que se requiere mayor temperatura o tiempo de calentamiento para su formación en cantidades detectables. Sólo detectan el compuesto en una muestra de leche esterilizada (de un total de 13 analizadas) (tratamiento 107-115°C, 20-40 minutos) y en una de leche en polvo (de un total de 5) (cuadro 32). Determinan también CML en leche evaporada y batido de cacao, pero en 1 de las 9 muestras de leche evaporada y en 2 de las 11 muestras de batido de cacao no se detecta el compuesto. En cambio, Büser et al. (1987), Hewedy et al. (1994) y Fenaille et al. (2006) encuentran CML en leche UHT y Hartkopf et al. (1994) en leche condensada (cuadro 32).

Charissou et al. (2007) detectan CML en productos a base de cereales, como galletas, cereales de desayuno y pan tostado (cuadro 32).

Cuadro 31. Lisina, CML y LAL, expresada en mg/100 g proteína, en los alimentos analizados.

	Lisina	CML	LAL
PCL A, 9 meses a 37°C	4711.36±399.48	69.08±6.94	ND
PCL B (con miel), 9 meses a 37°C	5511.19±119.12	118.17±11.81	ND
PCL C (con frutas), 9 meses a 37°C	5663.09±698.24	102.27±2.58	ND
Huevos cocidos 30 min	10504.01±1038.12	226.50±17.76	21.10±2.54
Huevos cocidos 60 min	8693.74±76.56	233.76±12.45	67.70±6.34
Bebida de soja 1	8531.70±1143.59	61.50±6.30	ND
Bebida de soja 2	7585.09±547.77	131.63±2.08	ND
Preparado en polvo para elaborar crepes	1119.16±33.45	440.43±9.67	ND

ND: No detectado

Cuadro 32. CML obtenida por distintos autores en distintos alimentos.

Autores	Alimento	CML
		mg/100 g proteína
Büser et al. (1987)	Leche UHT	25.9
Hartkopf et al. (1994)	Leche condensada	39.0
	Papilla infantil de cereales	1.1
Hewedy et al. (1994)	Leche UHT (142°C/ 32,60,128 seg)	2.6, 9.9,12.1*
	Leche UHT (148°C/ 16,32,128 seg)	1.1, 3.0,17.0*
Drusch et al. (1999)	Leche esterilizada	34.3
	Leche en polvo	7.1
	Leche evaporada	49.9
	Batido de cacao	15.7
Birlouez-Aragon et al. (2004)	Fórmulas para lactantes UHT	0.14
	Fórmulas para lactantes esterilizadas	0.17
Fenaille et al. (2006)	Leche UHT	3.4
	Fórmulas para lactantes en polvo	6.0
	Fórmulas para lactantes líquidas	6.3
Charissou et al. (2007)	Fórmulas para lactantes en polvo	0.9-1.2
	Fórmulas para lactantes líquidas	0.5-2.5
	Galletas	0.5-3.5
	Cereales de desayuno	0.6-0.8
	Pan tostado	0-1.3

\* Calculado en base al contenido proteico en leche UHT (Souci, 2000).

Sólo se detecta LAL en huevos cocidos durante 30 y 60 minutos (cuadro 31). Otros autores indican intervalos muy amplios para la LAL en huevo, que incluyen los valores obtenidos en este trabajo (cuadro 33).

En otros estudios tampoco se ha detectado LAL en PCL con frutas y vitaminas (D'Agostina et al., 2003) ni en leche en polvo (Damodaran, 2000), pero se han dado valores para leche evaporada (Damodaran, 2000), leche UHT (Faist et al., 2000; Damodaran, 2000; Fenaille et al., 2006), leche esterilizada (Faist et al., 2000), leches de crecimiento (D'Agostina et al., 2003) y fórmulas para lactantes (Faist et al., 2000; D'Agostina et al., 2003; Fenaille et al., 2006) (cuadro 33).

Existe gran variabilidad en los contenidos de CML y LAL en alimentos obtenidos por distintos autores, lo que puede atribuirse a la metodología utilizada en la determinación y/o a los tratamientos tecnológicos a los que se haya sometido las muestras durante su fabricación.

Cuadro 33. LAL obtenida por diferentes autores en distintos alimentos.

Autores	Alimento	LAL
		mg/100 g proteína
Belitz y Grosch (1985)	Clara de huevo cocida 30 min	37
Damodaran (2000)	Clara de huevo en polvo	16-182
	Leche evaporada	59-86
	Leche UHT	16-37
Faist et al. (2000)	Leche UHT	4.9-18.6
	Leche esterilizada	22.4-65.3
	Fórmulas para lactantes líquidas	1.4-8.8
D'Agostina et al. (2003)	Fórmulas para lactantes en polvo	ND
	Fórmulas para lactantes líquidas	Trazas-39.0
	Leches de crecimiento	9.8-51.4
Fenaille et al. (2006)	Leche UHT	2.8
	Fórmulas para lactantes en polvo	1.8
	Fórmulas para lactantes líquidas	8.5

ND: No detectado

La pérdida de lisina de los alimentos puede producirse, principalmente, por el desarrollo de la RM o por la formación de uniones de entrecruzamiento (*cross-links*) originando LAL (D'Agostina et al., 2003). La vía que prevalece en el caso de alimentos ricos en proteínas, pero con un bajo contenido en azúcares reductores, es la formación de LAL, como se ha observado, por ejemplo, en queso (Pellegrino et al., 1996); sin embargo, en alimentos ricos en proteínas y con un contenido importante en azúcares reductores, como sucede en la leche y otros

derivados lácteos, la RM es la vía más importante. Además, para la formación de LAL se requiere tratamientos térmicos severos. Por tanto, para la evaluación global de la calidad proteica durante el procesado o almacenamiento de las PCL es de mayor interés utilizar la CML como indicador de la pérdida de lisina que la LAL, e incluso es más interesante y de mayor especificidad la determinación de la furosina, parámetro indicador de las etapas iniciales de la RM, descrito en el apartado 4.3.1. de la tesis.

## Conclusiones

---



## CONCLUSIONES

*De la optimización y validación de los métodos de determinación de compuestos indicadores de la RM puede concluirse que:*

1. El método de determinación de aminoácidos por CLAR con detector de fluorescencia, previa derivatización con AQC, es exacto, reproducible y útil para la determinación de los aminoácidos, incluyendo metionina y cisteína, de las PCL. Los límites de detección y cuantificación obtenidos son menores a los obtenidos con otros derivatizantes.
2. Longitudes de onda de excitación y de emisión de 347 y 415 nm, respectivamente, indicadas en la bibliografía para la medida de la fluorescencia debida a AGEs fluorescentes en sistemas modelo, leche y fórmulas para lactantes, son también adecuadas para las PCL.

La determinación de AGEs y pentodil-lisina totales requiere una etapa de incubación previa de las PCL con 24 U de pronasa, a 25 °C, durante 30 minutos, para liberarlos de sus uniones a proteínas.

3. La determinación de CML por CG con detección FID, previa derivatización con MTBSTFA, es exacta y reproducible y permite medir simultáneamente CML, lisina y LAL en alimentos.

*De la determinación de aminoácidos en las PCL se deduce que:*

4. El perfil aminoacídico de las tres PCL analizadas es similar al de la leche, su principal componente.
5. Una ración de PCL (250 mL) contribuye de forma significativa al cumplimiento de las RDA de aminoácidos esenciales y semiesenciales de los lactantes (71-147%) y niños de corta edad (87-170%).
6. El índice químico estimado, utilizando la proteína de referencia de la FAO/OMS (1985), de las PCL analizadas viene dado por el contenido de triptófano (aminoácido limitante).

*Del estudio de la influencia del almacenamiento en la evolución de la RM en las PCL se concluye que:*

7. Los contenidos de furosina, los compuestos fluorescentes (AGEs fluorescentes y pentodil-lisina), y el desarrollo de color aumentan de forma gradual durante el almacenamiento de las PCL y con la temperatura.
8. El porcentaje medio de lisina bloqueada durante el almacenamiento de las PCL (6.4%) es menor al producido durante el procesado (10.3%), aunque tiene importancia desde el punto de vista nutricional.
9. Dado el mayor contenido de furosina de las PCL con miel, cabe señalar que este ingrediente, si bien mejora las características organolépticas de las papillas, favorece el desarrollo de las primeras etapas de la RM, hecho de especial importancia en este tipo de alimentos, destinados a un grupo de población con elevadas necesidades nutricionales.

10. El incremento más pronunciado de compuestos fluorescentes a partir del cuarto mes de almacenamiento señala el final del período de inducción en su desarrollo.
11. La mayoría de compuestos fluorescentes están unidos de forma covalente a proteínas, sólo una pequeña parte se encuentran en forma libre. Las correlaciones entre ambos no son significativas, lo que sugiere diferentes vías de formación.
12. Los compuestos coloreados no varían por pequeños cambios en la composición de las muestras (como la presencia de miel en un 0.9% o frutas 1.1%).
13. Las correlaciones parciales entre los indicadores de la RM estudiados (furosina, compuestos fluorescentes y color) no son significativas, lo que sugiere diferentes vías de formación. Según los resultados obtenidos, la formación de compuestos fluorescentes y coloreados por vías paralelas es la mayoritaria.

*De la determinación de CML en sistemas modelo y PCL se deduce que:*

14. La formación de CML depende en gran medida de la naturaleza de la proteína implicada en la reacción. En los sistemas modelo estudiados, la proteína que proporciona mayor cantidad de CML formada es la BSA, seguida de la soja, la caseína y el gluten.
15. El porcentaje de CML formado por hidrólisis ácida (HCl 6N) de fructosil-lisina es del 0.5%.

16. En las PCL recién elaboradas no se detecta CML ni LAL. La primera es detectable en muestras almacenadas durante 9 meses a 37°C, por lo que la formación de CML requiere un tiempo de almacenamiento prolongado y/o una temperatura de almacenamiento relativamente alta.

## Bibliografía

---



Ahmed, N., Argirov, O.K., Minhas, H.S., Cordeiro, C.A.A., Thornalley, P.J. 2002. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N<sub>ε</sub>-carboxymethyl-lysine- and N<sub>ε</sub>-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.*, 364, 1-14.

Albalá-Hurtado, S., Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C. 1997a. Determination of available lysine in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 778, 235-241.

Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M.T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. 1997b. Determination of free and total furfural compounds in infant milk formulas by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2128-2133.

Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J., López, J.C. 1996. HPLC method for cyst(e)ine and methionine in infant formulas. *J. Food Sci.*, 61, 1132-1135.

Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J., López, J.C. 1998. Determinación de aminoácidos en fórmulas para lactantes por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. *Alimentaria*, 295, 103-110.

Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J., López, J.C. 1999. Amino acid contents of infant formulas. *J. Food Compos. Anal.*, 12, 137-146.

Ames, J.M. 2001. Melanoidins as pro- or antioxidants. *Cerevisia*, 26, 210-216.

AOAC Official Methods of Analysis. 2002. 17<sup>th</sup> Edition. Vol. II. 993.21. Horwitz, W. (editor). Maryland, USA.

Basta, G., Lazzerini, G., Massaro, M., Simoncini, T., Tanganelli, P., Fu, C., Kislinger, T., Stern, D.M., Schmidt, A.M., De Caterina, R. 2002. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE. A mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*, 105, 816-822.

Belitz, H.D., Grosch, W. 1985. Aminoácidos, péptidos, proteínas. En *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia. pp. 7-74.

Belitz, H.D., Grosch, W. 1992. Leche y productos lácteos. En *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia. p. 540.

Berg, T.J., Clausen, J.T., Torjensen, P.A., Dahl-Jorgensen, K., Bangstad, H.J., Hanssen, K.F. 1998. The Advanced Glycation End Product N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine is increased in serum from children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 21, 1997-2002.

Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L. 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, 336, 93-104.

Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., Frost, B. 1987. A new, rapid, high-sensitivity analysis of amino acids in food type samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70, 241-247.

Birlouez-Aragon, I., Nicolas, M., Metais, A., Marchond, N., Grenier, J., Calvo, D. 1998. A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk. *Int. Dairy J.*, 8, 771-777.

- Birlouez-Aragon, I., Sabat, P., Lutz, B., Leclère, J., Nicolas, M. 1999. L'addition de lactose et de vitamine C dans les laits de croissance diminue la qualité nutritionnelle des protéines. *Lait*, 79, 595-606.
- Birlouez-Aragon, I., Leclère, J., Quedraogo, C.L., Birlouez, E., Grongnet, J.F. 2001. The FAST method, a rapid approach of the nutritional quality of heat-treated foods. *Nahrung/Food*, 45, 201-205.
- Birlouez-Aragon, I., Sabat, P., Gouti, N. 2002. A new method for discriminating milk heat treatment. *Int. Dairy J.*, 12, 59-67.
- Birlouez-Aragon, I., Pischetsrieder, M., Leclère, J., Morales, F.J., Hasenkopf, K., Kientsch-Engel, R., Ducauze, C.J., Rutledge, D. 2004. Assessment of protein glycation markers in infant formulas. *Food Chem.*, 87, 253-259.
- Birlouez-Aragon, I., Locquet, N., Louvent, E.D., Bouveresse, D.J.R., Stahl, P. 2005. Evaluation of the Maillard reaction in infant formulas by means of front-face fluorescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 308-318.
- Blatná, J., Dostálová, J., Eisenberger, B., Holasová, M., Pickova, J., Simova, J. 1983. Czechoslovak cereal-based baby foods. Developments in Food Science, 5B. *Prog. Cereal Chem. Technol.* pp.1141-1145
- Bosch, L., Alegría, A., Farré, R. 2005. RP-HPLC Determination of tiger nut and orgeat amino acid contents. *Food Sci. Technol. Int.*, 2, 33- 40.
- Bosch, L., Alegría, A., Farré, R. 2006. Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *J. Chromatogr. B*, 831, 176-183.

Boschin, G., Scaglioni, L., Arnoldi, A. 1999. Optimization of the synthesis of the cross-linked amino acid ornithinoalanine and nuclear magnetic resonance characterization of lysinoalanine and ornithinoalanine. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 939-944.

Bueno, M., Bueno, G. 2003. Nutrición infantil y crecimiento. En Bueno, M., Sarría, A., Pérez-González, J. M. *Nutrición en pediatría*. Madrid: Ergon. pp.1-10.

Bujard, E., Finot, P.A. 1978. Mesure de la disponibilité et du blocage de la lysine dans les laits industriels. *Ann. Nutr. Alim.*, 32, 291-305.

Büser, W., Erbersdobler, H.F. 1986. Carboxymethyllysine, a new compound of heat damage in milk products. *Milchwissenschaft*, 41 (12), 780-781.

Büser, W., Erbersdobler, H.F., Liardon, R. 1987. Identification and determination of N<sup>6</sup>-carboxymethyllysine by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 387, 515-519.

Cai, W., Gao, Q., Zhu, L., Peppas, M., He, C., Vlassara, H. 2002. Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol. Med.*, 8, 337-346.

Calcagno, C., Evangelisti, F., Zunin, P. 1996. Influenza della conservazione sulla qualità proteica di alimenti in polvere per la prima infanzia. *Riv. Sci. Alim.*, 4, 381-386.

Calvo, C. 2004. Optical properties. En Nollet, L. M. L. *Handbook of food analysis. Physical characterization and nutrient analysis*, vol. 1. New York: Marcel Dekker, Inc. pp.1-19.

- Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M. 2005. Evaluación del pardeamiento no enzimático en alimentos derivados de cereales. *Alim. Nutri. Salud*, 12, 91-100.
- Carpenter, K.J. 1960. The estimation of available lysine in animal protein foods. *Biochem. J.*, 77, 604-610.
- Carratù, B., Boniglia, C., Filesi, C., Bellomonte, G. 1993. Influenza del trattamento tecnologico sugli alimenti: determinazione per cromatografia ionica di piridossina e furosina in prodotti dietici ed alimentari. *Riv. Sci. Alim.*, 4, 455-457.
- Casado de Frías, E., Maluenda Carrillo, C., Casado Sáenz, E. 1993. Alimentación del niño. En *Nutricion y Dietética. Aspectos sanitarios*. Tomo 1. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. pp. 383-403.
- Charissou, A., Ait-Ameur, L., Birlouez-Aragon, I. 2007. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *J. Chromatogr. A*, 1140, 189-194.
- Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C. 2006. Evolution of potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage. *Food Res. Int.*, 39, 536-543.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. 1989. Propiedades físico-químicas de los aminoácidos y de las proteínas. En *Proteínas alimentarias*. Zaragoza: Acribia. pp. 5-36.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. 1993. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En Fennema, O.R., *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia. pp. 275-414.

Cheftel, J.C., Cheftel, H. 1999. Pardeamiento no enzimático. En *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia. pp. 291-308.

Chuyen, N.V. 1998. Maillard reaction and food processing. En *Process-induced chemical changes in food*. Shahidi et al., Eds. New York: Plenum Press. pp. 213-235.

Claeys, W.L., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. 2003. Kinetics of hydroxymethylfurfural, lactulose and furosine formation in milk with different fat content. *J. Dairy Res.*, 70, 85-90.

Cohen, S.A., De Antonis, K.M. 1994. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *J. Chromatogr. A*, 611, 25-34.

Cohen, S.A., Michaud, D.P. 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 211, 279-287.

Corzo, N., Delgado, T. 1991. Furosina, un buen indicador de las primeras etapas de reacción de Maillard. *Alimentación, Equipos y Tecnología.*, 6, 73-77.

Corzo, N., López-Fandiño, R., Delgado, T., Ramos, M., Olano, A. 1994. Changes in furosine and proteins of UHT-treated milks stored at high ambient temperatures. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 198, 302-306.

Cubedo, A. 1990. Quantitative analysis of methionine, cysteine and lysine in feeds by reverse-phase liquid chromatography using precolumn derivatization with 9-fluoenylmethyl chloroformate: preliminary study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73, 935-939.

- D'Agostina, A., Boschin, G., Rinaldi, A., Arnoldi, A. 2003. Updating on the lysinoalanine content of commercial infant formulae and beicost products. *Food Chem.*, 80, 483-488.
- Damodaran, S. 2000. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En Fennema, O.R., *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia. pp. 384-511.
- Del Castillo, M.D. 1999. Determinación de compuestos de Amadori en alimentos y muestras biológicas. *Cromatografía y Técnicas Afines*, 20, 4-8.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M.P. 2002. Copper metabolism in rats fed diets containing Maillard reaction products. *J. Food Sci.*, 67, 855-860.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M.P. 2004. Bioavailability of iron from a heat treated glucose-lysine model food system: assays in rats and in Caco-2 cells. *J. Sci. Food Agric.*, 84, 1507-1513.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M.P. 2006. Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products: *in vitro* and *in vivo* assays. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 271-278.
- Directiva 2006/125/CE, de 5 de diciembre de 2006, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 339, 16-35.
- Dittrich, R., Hoffmann, I., Stahl, P., Müller, A., Beckmann, M.W., Pischetsrieder, M. 2006. Concentrations of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in human breast milk, infant formulas, and urine of infants. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 6924-6928.

Dodd, N.S., Ratanani, J. 1988. Protein content and amino acid profile of selected commercial infant and weaning foods. *J. Fd. Sci. Technol.*, 25, 317-318.

Dunn, J.A., Ahmed, M.U., Murtiashaw, M.H., Richardson, J.M., Walla, M.D., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. 1990. Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: Formation of N-(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochem.*, 29, 10964-10970.

Dunn, J.A., McCance, D.R., Thorpe, S.R., Lyons, T.J. Baynes, J.W. 1991. Age-dependent accumulation of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine and N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochem.*, 30, 1205-1210.

Dupont, C. 2003. Protein requirements during the first year of life. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77, 1544S-1549S.

Drusch, S., Faist, V., Erbersdobler, H.F. 1999. Determination of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.*, 65, 547-553.

Erbersdobler, H.F., Dehn-Müller, B. 1989. Formation of early Maillard products during UHT treatment of milk. *Bull. IDF.*, 238, 62-67.

Erbersdobler, H.F., Hupe, A. 1991. Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Z. Ernährungswiss.*, 30, 46-49.

ESPGAN. 1981. Guidelines on infant nutrition: recommendations for the composition of a follow-up formula and for the Beikost. *Acta Paed. Scand.*, 287, 39-46.

- Evangelisti, F., Calcagno C., Nardi, S., Zunin, P. 1999a. Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks. *J. Dairy Res.*, 66, 237-243.
- Evangelisti, F., Calcagno C., Zunin, P., Nardi, S. 1999b. Influenza delle tecnologie di produzione sulla formulazione di alimenti per la prima infanzia. *Industrie Alimentari*, 38, 1401-1405.
- Faist, V., Drusch, S., Kiesner, C., Elmadfa, I., Erbersdobler, H.F. 2000. Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by high-performance chromatography after derivatisation with dansyl chloride. *Int. Dairy J.*, 10, 339-346.
- Faist, V., Müller, C., Drusch, S., Erbersdobler, H.F. 2001. Selective fortification of lysinoalanine, fructoselysine and N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in casein model systems. *Nahrung/Food*, 45, 218-221.
- FAO/OMS. 1985. Energy and protein requirement. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Geneva, Switzerland.
- Fenaille, F., Parisod, V., Visani, P., Populaire, S., Tabet, J.C., Guy, P.A. 2006. Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *Int. Dairy J.*, 16, 728-739.
- Fernández-Artigas, P., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E., 1999a. Blockage of available lysine at different stages of infant cereal production. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 851-854.
- Fernández-Artigas, P., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. 1999b. Browning indicators in model systems and baby cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2872-2878.

Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., Romero, F. 1999. Review: Indicators of damage of protein quality and nutritional value of milk. *Food Sci. Tech. Int.*, 5, 447-461.

Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R. 2000a. Advanced glycosilation end products (AGEs) and colour in milk and milk resembling systems. A review. *Recent Res. Devel. Agric. Food Chem.*, 4, 269-290.

Ferrer, E., Alegría, A., Courtois, G., Farré, R. 2000b. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *J. Chromatogr. A*, 881, 599-606.

Ferrer, E. 2001. Estudio del valor nutritivo de fórmulas para lactantes. Parámetros indicadores de su alteración. Tesis Doctoral. Valencia.

Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., Romero, F. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas. Changes during heat treatment and storage. *J. Chromatogr. A*, 947, 85-95.

Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., Romero, F. 2003a. Fluorometric determination of chemically available lysine: Adaptation, validation and application to different milk products. *Nahrung/Food*, 47, 403-407.

Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., Romero, F., Clemente, G. 2003b. Evolution of available lysine and furosine contents in milk-based infant formulas throughout the shelf-life storage period. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 465-472.

- Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., Romero, F. 2005a. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas during full shelf-life. *Food Chem.*, 89, 639-645.
- Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Clemente, G., Calvo, C. 2005b. Fluorescence, browning index, and color in infant formulas during storage. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4911-4917.
- Fink, R., Kessler, G. 1986. HMF values in heat treated and stored milk. *Milchwissenschaft*, 41, 638-641.
- Finot, P.A., Deutsch, R., Bujard, E. 1981. The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. *Progr. Food Nutr. Sci.*, 5, 345-355.
- Finot, P.A., Mauron, J. 1969. Lysine blockade via Maillards reaction .I. Synthesis of n-(1-desoxy-d-fructos-1-yl)-l-lysine and n-(1-desoxy-d-lactulos-1-yl)-l-lysine. *Helv. Chim. Acta*, 52, 1488-1495.
- Food and Nutrition Board (FNB). 2005. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids (Macronutrients). Institute of Medicine of the National Academies. Washington, D.C. pp. 21-37 y pp. 589-768.
- Franzke, C., Iwainsky, H. 1954. Zur antioxidativen Wirksamkeit der Melanoidine. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 50, 251-254.
- Friedman, M. 1996. Food browning and its prevention: an overview. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 631-653.

Friedman, M. 1999. Chemistry, biochemistry, nutrition and microbiology of lysinoalanine, lanthionine and histidinoalanine in food and others proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1295-1349.

Fu, M.X., Requena, J.R., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Baynes, J.W., Thorpe, S.R. 1996. The Advanced Glycation End Product, N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycooxidation reactions. *J. Biol. Chem.*, 271, 9982-9986.

Gironés, X., Guimerà, A., Cruz-Sánchez, C.Z., Ortega, A., Sasaki, N., Makita, Z., Lafuente, J.V., Kalaria, R., Cruz-Sánchez, F.F. 2004. N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 1241-1247.

Gliguem, H., Birlouez-Aragon, I. 2005. Effects of sterilization, packaging, and storage on vitamin C degradation, protein denaturation, and glycation in fortified milks. *J. Dairy Sci.*, 88, 891-899.

Goldberg, T., Cai, W., Peppas, M., Dardaine, V., Baliga, B.S., Uribarri, J., Vlassara, H. 2004. Advanced glycooxidation end products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Ass.*, 104, 1287-1291.

Goodno, C.C., Swaisgood, H.E., Catignani, G.L. 1981. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Anal. Biochem.*, 115, 203-211.

Guan, R., Liu, D., Ye, X., Yang, K. 2005. Use of fluorometry for determination of skim milk powder adulteration in fresh milk. *J. Zhejiang Univ. SCI.*, 6B, 1101-1106.

Guerra-Hernández, E., Corzo, N. 1996. Furosine determination in baby cereals by ion-pair reversed-phase liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 73, 729-731.

- Guerra-Hernández, E., Corzo, N., Garcia-Villanova, B. 1999. Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *J. Cereal Sci.*, 29, 171-176.
- Guerra-Hernández, E., Leon, C., Corzo, N., García-Villanova, B., Romera, J.M. 2002. Chemical changes in powdered infant formulas during storage. *Int. J. Dairy Technol.*, 55, 171-176.
- Hartkopf, J., Pahlke, C., Lüdemann, G., Erbersdobler, H.F. 1994. Determination of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine by a reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *J. Chromatogr. A*, 672, 242-246.
- Hasenkopf, K., Rönner, B., Hiller, H., Pischetsrieder, M. 2002. Analysis of glycated and ascorbylated proteins by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5697-5703.
- Heems, D., Luck, G., Fraudeau, C., Vérette, E. 1998. Fully automated precolumn derivatization, on-line dialysis and high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in food, beverages and feedstuff. *J. Chromatogr. A*, 798, 9-17.
- Hein, G., Wiegand, R., Lehmann, G., Stein, G., Franke, S. 2003. Advanced glycation end-products pentosidine and N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology*, 42, 1242-1246.
- Henle, T., Zehetner, G., Klostermeyer, H. 1995. Fast and sensitive determination of furosine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 200, 235-237.
- Hernández, T., Hernández, A., Martínez, C. 1996. Calidad de proteínas. Conceptos y evaluación. *Alimentaria*, julio-agosto, 27-37.

Hernández, M. 1999. Particularidades de la nutrición en la infancia: crecimiento y nutrición y Alimentación en la primera infancia. En Hernández, M., Sastre, A. *Tratado de nutrición*, Madrid: Díaz de Santos. pp. 799-829.

Hernández-Orte, P., Ibarz, M.J., Cacho, J., Ferreira, V. 2003. Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method. *Chromatographia*, 58, 29-35.

Hewedy, M.M., Kiesner, C., Meissner, K., Hartkopf, J., Erbersdobler, H.F. 1994. Effects of UHT heating of milk in an experimental plant on several indicators of heat treatment. *J. Dairy Res.*, 61, 305-309.

Hiramoto, S., Itoh, K., Shizuuchi, S., Kawachi, Y., Morishita, Y., Nagase, M., Suzuki, Y., Nobuta, Y., Sudou, Y., Nakamura, O., Kagaya, I., Goshima, H., Kodama, Y., Icatro, F.C., Koizumi, W., Saigenji, K., Miura, S., Sugiyama, T., Kimura, N. 2004. Melanoidin, a food protein-derived advanced Maillard reaction product, supresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter*, 9, 429-435.

Hodge, J.E. 1953. Dehydrated foods. Chemistry of browning reaction in model systems. *J. Agric. Food. Chem.*, 1, 928-943.

Hofmann, S.M., Dong, H.J., Li, Z., Cai, W., Altomonte, J., Thung, S.N., Zeng, F., Fisher, E.A., Vlassara, H. 2002. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the *db/db* mouse. *Diabetes*, 51, 2082-2089.

Hurrell, R.F., Finot, P.A., Ford, J.E. 1983. Storage of milk powders under adverse conditions. *Br. J. Nutr.*, 49, 355-364.

- Jirapa, P., Normah, H., Zamaliah, M.M., Asmah, R., Mohamad, K. 2001. Nutritional quality of germinated cowpea flour (*Vigna unguiculata*) and its application in home prepared powdered weaning foods. *Plant Food Hum. Nutr.*, 56, 203-216.
- Jobson, J.D. 1991. Multiple Linear Regression. En *Applied multivariate data analysis*, vol.1. New York: Springer-Verlag. pp.314-317.
- Kessler, H.G., Fink, R. 1986. Changes in heated and stored milk with an interpretation by reaction kinetics. *J. Food Sci.*, 51, 1105-1111.
- Knoll, J.E. 1985. Estimation of the limit of detection in chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 23, 422-425.
- Koschinsky, T., He, C.J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., Heitmann, K., Vlassara, H. 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6474-6479.
- Krajcovicová-Kudláčková, M., Sebeková, K., Schinzel, R., Klvanová, J. 2002. Advanced glycation end products and nutrition. *Physiol. Res.*, 51, 313-316.
- Krause, R., Knoll, K., Henle, T. 2003. Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 277-283.
- Kulmyrzaev, A., Dufour, E. 2002. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy. *Lait*, 82, 725-735.

Leclère, J., Birlouez-Aragon, I. 2001. The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4682-4687.

Leclère, J., Birlouez-Aragon, I., Meli, M. 2002. Fortification of milk with iron-ascorbate promotes lysine glycation and tryptophan oxidation. *Food Chem.*, 76, 491-499.

Lee, K., Shibamoto, T. 2002. Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: Review. *Food Rev. Int.*, 18, 151-175.

Lindsay, S. 1992. High Performance Liquid Chromatography. Thames Polytechnic, London. pp. 236-237.

Liu, H.J. 1994. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, 670, 59-66.

Liu, H.J., Chang, B.Y., Yan, H.W., Yu, F.H., Liu, X.X. 1995. Determination of amino acids in food and feed by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and reversed-phase liquid chromatographic separation. *J. AOAC Int.*, 78, 736-744.

Maillard, L.C. 1912. Action des acides amines sur les sucres. Formation des melanoidines par voie methodique. *C. R. Acad. Sci.*, 154, 66-68.

Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., Lericci, C.R. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 340-346.

- Martínez, M. J., Hernández, M. 1993. Alimentación durante el primer año de vida. En Hernández, M. *Alimentación infantil*. Madrid: Díaz de Santos. pp. 43-53.
- Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., van Boeckel, M.A.J.S. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 364-373.
- Matiacevich, S.B., Santagapita, P.R., Buera, M.P. 2005. Fluorescence from the Maillard reaction and its potential applications in food science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 483-495.
- Matiacevich, S.B., Buera, M.P. 2006. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chem.*, 95, 423-430.
- Meade, S. J., Reid, E.A., Gerrard, J.A. 2005. The impact of processing on the nutritional quality of food proteins. *J. AOAC Int.*, 88, 904-922.
- Mercasa. 2005. Alimentación infantil. En *Alimentación en España. Producción, industria, distribución y consumo* (8th ed). Madrid: Empresa Nacional Mercasa. pp. 327-330.
- Mercasa. 2006. Alimentación infantil. En *Alimentación en España. Producción, industria, distribución y consumo* (9th ed). Madrid: Empresa Nacional Mercasa. pp. 338-340.
- Montaño, A., Casado, F.J., de Castro, A., Sánchez, A.H., Rejano, L. 2004. Vitamin content and amino acid composition of pickled garlic processed with and without fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7324-7330.

Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S. 1995. New methodologies for kinetic study of 5-(hydroxymethyl)-furfural formation and reactive lysine blockage in heat-treated milk and model systems. *J. Food Protect.*, 58, 310-315.

Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S. 1996a. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chem.*, 57, 423-428.

Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S. 1996b. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 31, 411-418.

Morales, F.J., van Boekel, M.A.J.S. 1997. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescence accumulation. *Int. Dairy J.*, 7, 675-683.

Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S. 1997. A kinetic study on 5-hydroxymethylfurfural formation in Spanish UHT milk stored at different temperatures. *J. Food Sci. Technol.*, 34, 28-32.

Nasirpour, A., Scher, J., Desobry, S. 2006. Baby foods: Formulations and interactions (A review). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46, 665-681.

Navas, M.J., Boccio, M., Kuskoski, E.M., Asuero, A.G. 2005. Evaluación de la calidad de las proteínas. II. Métodos *in vitro*. *Alimentaria*, 360, 17-28.

Nurnsten, H. 2005. The Maillard reaction. Chemistry, biochemistry and implications. London: The Royal Society of Chemistry. pp.112-120.

O'Brien, J., Morrissey, P.A. 1989. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 28, 211-248.

- Olano, A., Santa-María, G., Corzo, N., Calvo, M.M., Martínez-Castro, I., Jimeno, M.L. 1992. Determination of free carbohydrates and Amadori compounds formed at the early stages of non-enzymatic browning. *Food Chem.*, 43, 351-358.
- Olano, A., Martínez-Castro, I. 1996. Nonenzymatic browning. In Handbook of food analysis. L.M.L. Nollet, Ed. New York: Marcel Decker., 1683-1721.
- Oliver, C.M., Melton, L.D., Stanley, R.A. 2006. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46, 337-350.
- Orden de 14 de julio de 1999 por la que se actualizan los anexos del Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. B.O.E. núm. 173 de 21 de julio de 1999, 27251-27252.
- Pagliarini, E., Vernile, M., Peri, C. 1990. Kinetic study on color changes in milk due to heat. *J. Food Sci.*, 55, 1766-1767.
- Palombo, R., Gertler, A., Saguy, I. 1984. A simplified method for determination of browning in dairy powders. *J. Food Sci.*, 49, 1609-1613.
- Pellegrino, L., Resmini, P., De Noni, I., Masotti, F. 1996. Sensitive determination of lysinoalanine for distinguishing natural from imitation mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 79, 725-734.
- Pellett, P.L., Mathew, S.P. 1986. Protein quality of homemade weaning food mixtures: 2. Amino acid composition versus biological methods. *Ecol. Food Nutr.*, 19, 41-49.

Pencharz, P.B., Ball, R.O. 2004. Amino acid needs for early growth and development. *J. Nutr.*, 134, 1566S-1568S.

Pérez-Chóliz, V. 2003. Alimentación complementaria. Diversificación dietética y destete. In Bueno, M., Sarría, A., Pérez-González, J. M. *Nutrición en pediatría*. Madrid: Ergon. pp.149-154.

Petrovic, R., Futas, J., Chandoga, J., Jakus, V. 2005. Rapid and simple method for determination of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine and N<sup>ε</sup>-(carboxyethyl)lysine in urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 19, 649-654.

Pizzoferrato, L., Manzi, P., Vivanti, V., Nicoletti, I., Corradini, C., Cogliandro, E. 1998. Maillard reaction in milk-based foods: Nutritional consequences. *J. Food Prot.*, 61, 235-239.

Pompei, C., Rossi, M., Mare, F. 1987. Protein quality in commercial milk-based infant formulas. *J. Food Quality*, 10, 375-391.

Ponquett, R. 2002. Maillard reaction flavours. *Food Rev.*, august, 25-27.

Rada-Mendoza, M., Olano, A., Villamiel, M. 2002a. Furosine as indicator of Maillard reaction in jams and fruit-based infant foods. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4141-4145.

Rada-Mendoza, M., Olano, A., Villamiel, M. 2002b. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chem.*, 79, 513-516.

- Rada-Mendoza, M., Sanz, M.L., Olano, A., Villamiel, M. 2004. Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. *Food Chem.*, 85, 605-609.
- Ramírez-Jiménez, A. 2001. Pardeamiento químico en derivados de cereales: productos panarios y cereales infantiles. Tesis Doctoral. Granada.
- Ramírez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. 2003. Evolution of non-enzymatic browning during storage of infant rice cereal. *Food Chem.*, 83, 219-225.
- Ramírez-Jiménez, A., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E. 2004a. Nonenzymatic browning during storage of infant cereals. *Cereal Chem.*, 81, 399-403.
- Ramírez-Jiménez, A., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E. 2004b. Effect of storage conditions and inclusion of milk on available lysine in infant cereals. *Food Chem.*, 85, 239-244.
- Rampilli, M., Andreini, R. 1992. Evaluation of colour components in sterilized milk. *Ital. J. Food Sci.*, 4, 285-291.
- Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. B.O.E. núm. 83 de 7 de abril de 1998, 11638-11643.

Real Decreto 1445/2000, de 31 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. B.O.E. núm. 183 de 1 de agosto de 2000, 27562-27563.

Real Decreto 480/2004, de 26 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. B.O.E. núm. 80 de 2 de abril de 2004, 14049-14050.

Reddy, S., Bichler, J., Wells-Knecht, K.J., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. 1995. N<sup>ε</sup>-(Carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochem.*, 34, 10872-10878.

Resmini, P., Pellegrino, L. 1994. HPLC of furosine for evaluating Maillard reaction damage in skim milk powders during processing and storage. *Bull. IDF*, 298, 31-36.

Ronayne de Ferrer, P.A. 1995. Pasado y presente en el diseño de las fórmulas infantiles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 45, 265-273.

Rossi, M., Pompei, C. 1991. Changes in liquid milk-based infant formulas during long-term storage. *Ital. J. Food Sci.*, 1, 49-57.

Rozan, P., Lamghari, R., Linder, M., Villaume, C., Fanni, J., Parmentier, M., Méjean, L. 1997. *In vivo* and *in vitro* digestibility of soybean, lupine and rapeseed meal proteins after various technological processes. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1762-1769.

Sanz, M.L., Olano, A., del Castillo, M.D. 2003. Nuevos indicadores químicos para el control de la calidad de alimentos. *Alim. Nutri. Salud*, 10, 91-99.

Sarwar, G., Botting, H.G., Peace, R.W. 1988. Complete amino acid analysis in hydrolysates of foods and feces by liquid chromatography of precolumn phenylisothiocyanate derivatives. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1172-1175.

Sarwar, G., Botting, H.G., Peace, R.W. 1989. Amino acid rating method for evaluating protein adequacy of infant formulas. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 622-626.

Schaafsma, G. 1989. Effect of heat treatment on the nutritional value of milk. *Bull. IDF*, 238, 68-70.

Sebeková, K., Krajcovicová-Kudlácková, M., Schinzel, R., Faist, V., Klvanová, J., Heidland, A. 2001. Plasma levels of advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet. *Eur. J. Nutr.*, 40, 275-281.

Sebeková, K., Hofmann, T., Boor, P., Sebeková, K., Ulicná, O., Erbersdobler, H.F., Baynes, J.W., Thorpe, S.R., Heidland, A., Somoza, V. 2005. Renal effects of oral Maillard reaction product load in the form of bread crusts in healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1043, 482-491.

Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., López-Frías, M., Muñoz-Hoyos, A., Galdó, G., Navarro, M.P. 2006. Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 1082-1088.

Siegl, T., Schwarzenbolz, U., Henle, T. 2000. Irreversible casein oligomerisation and formation of fluorescent crosslink amino acids in dairy products. *Czech J. Food Sci.*, 18, 72-73.

Silván, J.M., van de Lagemaat, J., Olano, A., del Castillo, M.D. 2006. Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1543-1551.

Somoza, V. 2005. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 663-672.

Somoza, V., Wenzel, E., Weiß, C., Clawin-Rädecker, I., Grübel, N., Erbersdobler, H.F. 2006. Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 833-841.

Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. 2000. *Food composition and nutrition tables* (6th ed). Germany: Medpharm GmbH Scientific Publisher.

Strydom, D.J., Cohen, S.A. 1994. Comparison of amino acid analyses by phenylisothiocyanate and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate precolumn derivatization. *Anal. Biochem.*, 222, 19-28.

Suhasini, A.W., Malleshi, N.G. 2003. Nutritional and carbohydrate characteristics of wheat and chickpea based weaning foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 54, 181-187.

Takeuchi, M., Yamagishi, S. 2004. TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. *Med. Hypotheses*, 63, 449-452.

- Tauer, A., Hasenkopf, K., Kislinger, T., Frey, I., Pischetsrieder, M. 1999. Determination of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in heated milk products by immunochemical methods. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 72-76.
- Thornalley, P.J., Battah, S., Ahmed, N., Karachalias, N., Agalou, S., Babaei-Jadidi, R., Dawnay, A. 2003. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.*, 375, 581-592.
- Uribarri, J., Peppas, M., Cai, W.J., Goldberg, T., Lu, M., Baliga, S., Vassalotti, J.A., Vlassara, H. 2003. Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *Am. J. kidney Dis.*, 42, 532-538.
- Van Boekel, M.A.J.S. 1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.*, 62, 403-414.
- Viadel, B., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J. 1999. Evaluación de un método para la determinación por CLAR de triptófano en fórmulas para lactantes. *Alimentaria*, 303, 165-167.
- Viadel, B., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., Romero, F. 2000. Amino acid profile of milk-based infant formulas. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 51, 367-372.
- Vigo, M.S., Malec, L.S., Gomez, R.G., Llosa, R.A. 1992. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of reactive lysine in dairy products. *Food Chem.*, 44, 363-365.
- Vlassara, H. 2005. Advanced glycation in health and disease role of the modern environment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1043, 452-460.

Zamora, R., Hidalgo, F.J. 2005. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to nonenzymatic food browning. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 49-59.

## Difusión de resultados

---



---

**Artículos**

- Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R. 2006. Application of the 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *J. Chromatogr. B*, 831, 176-183.
- Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R. 2006. Amino acid contents of infant foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 57, 212-218.
- Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R.; Clemente, G. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. *Food Chem.* (en impresión).
- Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R.; Clemente, G. Influence of storage conditions on furosine formation in milk-cereal based baby foods. *Food Chem.* (en revisión).
- Bosch, L.; Sanz, M.L.; Montilla, A.; Alegría, A.; Farré, R.; del Castillo, M.D. Simultaneous analysis of lysine, N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine and lysinoalanine from proteins. *J. Chromatogr. B* (en revision).

Otro artículo relacionado:

- Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R. 2005. RP-HPLC Determination of tiger nut and orgeat amino acid contents. *Food Sci. Technol. Int.*, 2, 33-40.

## Congresos

- Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P.; Romero, F. Contenido de aminoácidos en papillas de cereales con leche. I Congreso de la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). Madrid. Marzo 2005.

Abstract en *Nutrición hospitalaria*, 2005, XX (1), pp.65-66.

- Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P.; Romero, F. Infant food indicators of Maillard Reaction. Congreso Euro Food Chem XIII. Hamburgo, Alemania. Septiembre 2005.

Proceedings of the Euro Food Chem XIII Congress. Macromolecules and their degradation products in food-Physiological, analytical and technological aspects. Edited by Eklund T., Schwarz M., Steinhart H., Thier H., Winterhalter P. pp. 559-562.

- Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R. Milk-cereal based infant foods: Formation of furosine during storage. Congreso Cost Action 927-IMARS. The Maillard reaction in food and Medicine. Nápoles, Italia. Mayo 2006.

Abstract en Cost Action 927-IMARS. The Maillard reaction in food and Medicine. pp. P32.

- Bosch, L.; Sanz, M.L.; Montilla, A.; Alegría, A.; Farré, R.; Del Castillo, M.D. Simultaneous analysis of crosslinking and Maillard Reaction products in thermal processed food proteins. Congreso Cost

Action 927-IMARS. The Maillard reaction in food and Medicine.  
Nápoles, Italia. Mayo 2006.

Abstract en Cost Action 927-IMARS. The Maillard reaction in food  
and Medicine. pp. P12.